

**„Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente des anaerob induzierbaren *GapC4*
Promotors aus Mais in heterologen Systemen
sowie
Proteinbindungsstudien mit Kernfaktoren aus aeroben und anaerob induzierten
Tabakblättern“**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Robert Geffers
aus Hohenhameln-Rötzum

1. Referent:	Privatdozent Dr. habil. R. Hehl
2. Referent:	Professor Dr. R.-R. Mendel
eingereicht am:	08.11.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am:	30.03.2001
	2001
	(Druckjahr)

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Geffers, R., Cerff, R. & Hehl, R. Anaerobiosis-specific interaction of tobacco nuclear factors with *cis*-regulatory sequences in the maize *GapC4* promoter. *Plant Mol Biol* 43(1), 11-21 (2000)

Geffers, R., Sell, S., Düber, S., Cerff, R. & Hehl, R. Similar *cis*-sequence requirements for gene expression of a maize promoter in yeast and tobacco. *Mol Gen Genet* (*sub.* 2000)

Tagungsbeiträge

Geffers, R., Cerff, R., Hehl, R.: Identification of *cis*-acting elements responsible of anaerobic induction of the maize *GapC4* promoter in transgenic tobacco. (Poster) GBM Tagung, Tübingen (1997)

Geffers, R., Cerff, R., Hehl, R.: Interaction of anaerobiosis specific nuclear factors with a novel anaerobic response element. (Poster) XI. Kongreß: Molekularbiologie der Pflanze, Dabringhausen (1998)

Geffers, R., Cerff, R., Hehl, R.: Interaction of tobacco nuclear factors with *cis*-regulatory elements in the maize *GAPC4* promoter. (Poster) XVI. International Botanical Congress, St.Louis (MO,USA) (1999)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN.....	V
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>14</u>
2.1 BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME.....	14
2.2 PLASMIDE.....	14
2.3 ALLGEMEINE METHODEN	15
2.4 ENZYMSYSTEME UND KITS.....	15
2.5 EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN.....	16
2.5.1 RNA (PAHNKE, PERS. MITTEILUNG).....	16
2.5.2 mRNA	16
2.6 PCR.....	17
2.6.1 IN VIVO PCR.....	17
2.6.2 IN VITRO PCR	17
2.7 UNTERSUCHUNGEN AN TRANSGENEM TABAK.....	17
2.7.1 GAPC4 -PROMOTORDELETIONEN	17
2.7.1.1 5'Deletionsprimer:	18
2.7.1.2 3'Deletionsprimer:	18
2.7.1.3 DNA Konstrukte.....	19
2.7.1.3.1 PCR-Fragmentklonierung in pCR 2.01	19
2.7.1.3.2 Klonierung der 5' deletierten Promotorelemente	19
2.7.1.3.3 Klonierung der 3' deletierten Promotorelemente:	19
2.7.1.3.4 Klonierung des ARE Fragments:.....	20
2.7.1.4 Nomenklatur:	20
2.7.2 TRANSFORMATION VON TABAK	22
2.7.3 STREßBEDINGUNGEN	22
2.7.4 QUALITATIVER GUS TEST.....	23
2.7.5 QUANTITATIVER GUS TEST	23
2.7.5.1 GUS Aktivitätsmessung am Fluoreszenz-Photometer	23

2.7.5.2	Berechnung der absoluten GUS-Aktivität.....	24
2.8	DNA-PROTEIN BINDUNGSSTUDIEN.....	24
2.8.1	STREßBEDINGUNGEN	24
2.8.2	KERNISOLIERUNG AUS TABAKBLÄTTERN.....	24
2.8.3	KERNPROTEINISOLIERUNG	24
2.8.4	DNA-ELEMENTE UND KOMPETITOREN FÜR DIE PROTEIN BINDUNGSSTUDIEN	25
2.8.5	RADIOAKTIVE DNA-MARKIERUNG	27
2.8.6	BINDUNGSBEDINGUNGEN UND NATIVES PAA-GEL.....	27
2.8.7	AUTORADIOGRAPHIE	28
2.9	ONE HYBRID SYSTEM.....	28
2.9.1	OLIGONUKLEOTIDE.....	28
2.9.2	DNA KONSTRUKTE	28
2.9.2.1	Klonierung des AREs vor die Reportergene in pBSKI und pYC7.....	29
2.9.3	HERSTELLUNG EINER ANAEROB INDUZIERTEN CDNA BANK	30
2.9.4	KLONIERUNG DER CDNA BANK IN pPC86	30
2.9.5	SYNTHETISCHES MINIMALMEDIUM FÜR HEFEN (SD: SYNTHETIC DROPOUT).....	30
2.9.6	HEFETRANSFORMATION.....	31
2.9.7	REPORTERHEFE.....	32
2.9.8	UNTERSUCHUNG DER REPORTERHEFE	32
2.9.8.1	Selektion auf His ⁻ Selektionsmedium	32
2.9.8.2	β -Galaktosidase Untersuchung.....	33
2.9.8.2.1	<i>in vivo</i> Test	33
2.9.8.2.2	Filterpapierabzug (Colony-Filter-Lift-Assay)	33
2.9.8.2.3	Flüssigkulturuntersuchung auf β -Galaktosidaseaktivität mit ONPG als Substrat	34
2.9.9	MINIPLASMIDPRÄPARATION AUS HEFE FÜR DIE ELEKTROPORATION VON E.COLI.....	35
2.9.10	PLASMID-DNA TRANSFORMATION VON E.COLI DURCH ELEKTROPORATION	35
2.9.10.1	Herstellen elektrokompenter Zellen.....	35
2.9.10.2	Elektrotransformation.....	36
2.9.11	CDNA SEQUENZIERUNG.....	36
2.9.12	DATENBANKANALYSE	36
2.10	SOUTH-WESTERN SCREEN.....	37
2.10.1	HERSTELLUNG DER SONDE	37
2.10.2	HERSTELLUNG DER ANAEROBEN CDNA BANK IN λ -ZAP EXPRESS TM	37

2.10.3	SCREENING-VERFAHREN	37
2.11	UNTERSUCHUNGEN IM TRANSIENTEN SYSTEM (TABAK)	39
2.11.1	DNA KONSTRUKTE: PROMOTORREKONSTRUKTION	39
2.11.2	TRANSFORMATION VON TABAKBLÄTTERN MIT DER PARTIKELKANONE	40
2.11.3	STREßBEDINGUNGEN	41
2.11.4	LUCIFERASETEST	41
2.11.5	GUS-TEST	42
2.11.6	BERECHNUNG DER RELATIVEN PROMOTORAKTIVITÄT	42
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>43</u>
3.1	UNTERSUCHUNGEN IN TRANSGENEN TABAKPFLANZEN: PROMOTORDELETIONEN ...	43
3.1.1	IDENTIFIZIERUNG EINES ANAEROB SENSITIVEN BEREICHS (ASB).....	43
3.1.2	UNTERSUCHUNG ORGANSPEZIFISCHER EXPRESSIONSMUSTER NACH DELETIONEN IM ANAEROB SENSITIVEN BEREICH	47
3.2	FUNKTIONELLE ANALYSE DES 20BP CARES	49
3.3	UNTERSUCHUNG TRANSIENTER GENEXPRESSION IN TABAKBLÄTTERN	51
3.3.1	EINFLUß DES ARE-TETRAMERS AUF DIE PROMOTORAKTIVITÄT	51
3.3.2	FUNKTIONELLE IDENTIFIZIERUNG <i>CIS</i> REGULATORISCHER ELEMENTE.....	54
3.4	DNA-PROTEIN BINDUNGSSTUDIEN	56
3.4.1	DNA-PROTEIN BINDUNGSSTUDIEN MIT DEM ARE-ELEMENT	57
3.4.1.1	Kernfaktoren binden spezifisch an das ARE	57
3.4.1.2	Bindungsstelle eines konstitutiv bindenden Kernfaktors an das ARE	59
3.4.2	TATA-BOX ELEMENT	63
3.4.2.1	Anaerob spezifische Interaktion von Kernfaktoren mit der TATA-Box	65
3.5	ISOLIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.....	67
3.5.1	ISOLIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN MIT DEM ONE HYBRID SYSTEM.....	67
3.5.2	ISOLIERUNG VON <i>TRANS FAKTOREN</i> DURCH DEN SOUTH-WESTERN SCREEN.....	72
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>73</u>
4.1	DER GAPC4 PROMOTOR VERMITTELT ANAEROB SPEZIFISCHE GENEXPRESSION, DEREN STÄRKE VERGLEICHBAR MIT DER DES KONSTITUTIV EXPRIMIERENDEN CAMV 35S PROMOTORS IST	73

4.2	ORGANSPEZIFISCHE CIS-ELEMENTE WERDEN IM GAPC4 PROMOTOR IM HETEROLOGEN PFLANZENSYSTEM TABAK NICHT ERKANNT	73
4.3	INNERHALB DES ANAEROB SENSITIVEN BEREICHES SPIELT EIN 50BP ELEMENT EINE BESONDERE ROLLE.....	74
4.4	TYPISCHE MOTIVE ANAEROB-SPEZIFISCHER PROMOTOREN LIEGEN IN FUNKTIONELLEN BEREICHEN DES GAPC4 AREs.....	75
4.5	DER ESSENTIELLE BEREICH FÜR DIE ANAEROBE GENEXPRESSION DURCH DAS GAPC4 ARE ENTHÄLT EINE C-MYB KONSENSUSSEQUENZ	78
4.6	KERNTAKTOREN BINDEN AN BEREICHE MIT ANAEROB SPEZIFISCHEN MOTIVEN INNERHALB DES AREs.....	79
4.7	REDUNDANZ ANAEROB SPEZIFISCHER MOTIVE IM GAPC4 PROMOTOR WIRKT SICH SYNERGISTISCH AUF DIE GENEXPRESSION AUS.....	80
4.8	TRANSKRIFTIONSFAKTOREN BINDEN AN DIE TATA-BOX, DIE FÜR DIE ANAEROBE GENEXPRESSION ESSENTIELL IST.....	82
4.9	REGULATORISCHE ELEMENTE DES GAPC4 PROMOTORS AKTIVIEREN REPORTERGEN-EXPRESSION IN DER HEFE.....	83
4.10	MODELL ZUR ANAEROBEN REGULIERUNG DES GAPC4 PROMOTORS.....	85
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>88</u>
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>91</u>
<u>7</u>	<u>ANHANG.....</u>	<u>110</u>
7.1	PROMOTORDELETION TRANSGENER TABAK: EINZELDATEN	110
7.1.1	5' PROMOTOR-DELETIONEN	110
7.1.2	3' PROMOTOR-DELETIONEN	115
7.2	ANAEROBE INDUKTION UND SEGREGATION (EINZELDATEN)	120
7.3	PROMOTORREKONSTRUKTION: TRANSIENTE EXPRESSIONSSTUDIEN IN TABAKBLÄTTERN (EINZELDATEN).....	122
7.4	MINIMALPROMOTOR: STUDIEN IM TRANSGENEN TABAK.....	129
7.5	GAPC4 PROMOTOR IN HEFE.....	130

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
<i>Adh</i>	Alkoholdehydrogenase
ANP	Anaerobe Proteine
Ap ^r	Ampicillinresistenz
ARE	Anaerobe Response Element
ASB	Anaerob spezifischer Bereich
λ	Bakteriophage Lambda
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cARE	Kernbereich des AREs
cDNA	RNA komplementäre, doppelsträngige DNA
cfu	Koloniebildungseinheiten (colony forming units)
cpm	Ausschlag pro Minute (counts per minute)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMF	N,N-dimethylformamid
DMS	Dimethylsulphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GapC	glykolytische GAPDH
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCBP-1	GC-Box bindendes Protein
GUS	β-Glucuronidase

h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Km ^r	Kanamycinresistent
LUC	Luciferase
M	Molar (mol/Liter)
Min.	Minute(n)
MUG	4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Glucuronid
MS	Murashige-Skoog (Vollmedium)
NAD ⁺	Nicotinamidadenosindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenosindinukleotid (reduziert)
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OHS	ONE HYBRID SYSTEM
ONPG	o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid
PAA	Polyacrylamid
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(ethanesulfonic acid)
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RPU	relative Proteineinheit
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
vergl.	vergleiche
w/v	Gewicht/Volumen
xg	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid

1 Einleitung

Für die meisten höheren Pflanzen ist die Verfügbarkeit von ausreichend freiem Wasser im Boden unbedingt erforderlich. Andererseits können übermäßige Wassermengen, wie beispielsweise bei Überschwemmungen nach starken Niederschlägen, die Pflanze nachhaltig schädigen. Es kommt zu einer Störung des natürlichen Gasaustausches in der Rhizosphäre. Der O₂ Austausch ist stark reduziert, da die erforderlichen Poren im Boden mit Wasser verstopft sind. Sauerstoffarme Bedingungen können im Wurzelbereich aber auch durch intensive Stoffwechselaktivitäten des natürlichen Bodenlebens (Edaphon) verursacht werden, die vorhandenen Sauerstoff verbrauchen. Besonders in warmen, feuchten Böden kann durch den Sauerstoffentzug von Mikroorganismen innerhalb von 24h der Stoffwechsel der Pflanzen von aerob auf vollständig anaerob umgestellt werden (Drew, 1997).

Vor allem bei den Kulturpflanzen sind die negativen Auswirkungen, die durch Überschwemmungen entstehen können, untersucht wurden (Drew, 1997). Dabei stellt sich die Frage, welche biochemischen Veränderungen führen zu einer erhöhten Toleranz gegenüber anaerob bedingtem Streß? Unterschiede zwischen toleranten und nicht toleranten Spezies sind Gegenstand aktueller physiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen.

Zellulärer und gewebeabhängiger Sauerstoffstatus in Pflanzen

Abgesehen von exogen erzeugter Anaerobiose entsteht endogene Sauerstoffarmut vorrangig durch 2 Mechanismen: Mangelnde Sauerstoffdiffusion in einem wenig ausgeprägten Interzellulärsystem und erhöhte Respirationsraten unter warmen Bedingungen oder in Folge starkem Wachstums. Eine kritische Sauerstoffkonzentration ([O₂]) ist erreicht, wenn die Respirationsrate durch fehlenden Sauerstoff limitiert wird. Gleichbedeutend ist dies mit dem fehlenden Endakzeptor in der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien. Das ATP/ADP Verhältnis sinkt.

Untersuchungen an mitochondrialer Cytochromoxidase aus Soja zeigen eine hohe Affinität zu molekularem Sauerstoff ($K_m = 0,14 \mu\text{M}$, Millar *et al.*, 1994), mit der die Pflanze versucht, trotz radial abnehmender Sauerstoffkonzentration im Wurzelgewebe -besonders in der Nähe der Wurzelspitze- die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien aufrecht zu erhalten. Experimente mit hypoxisch inkubierten Wurzeln (10% Sauerstoff im umgebenden Medium)

zeigten im Leitbündelgewebe sowohl typische Anreicherungen anaerob spezifischer Stoffwechselprodukte wie Alanin und Ethanol, als auch erhöhte Enzymaktivitäten von PDC (Pyruvatdecarboxylase) und ADH (Alkoholdehydrogenase), die aber nicht in der Wurzelrinde und der Epidermis beobachtet wurden (Thomson und Greenway, 1991). Zwischen der Wurzelrinde und dem Leitbündelgewebe liegt die Endodermis. Deren verdickte und suberinisierten Sekundärzellwände bilden eine Diffusionsbarriere (Casparischer Streifen) für Sauerstoff, wodurch im Leitbündelsystem leicht hypoxische Bedingungen entstehen. Die Wurzelrinde wird durch Aerenchyme vom Sproß mit Sauerstoff versorgt. Ethanol, welches im hypoxischen Leitbündelgewebe gebildet wird, diffundiert in benachbarte aerobe Gewebe der Wurzelrinde, wo es metabolisiert werden kann (Drew, 1988). In hypoxischen Geweben, wo die Regeneration von ATP über Glykolyse und Fermentation nur geringe Ausbeuten ermöglicht, wird dieses Defizit durch den symplastischen Transport von ATP aus aeroben Wurzelgewebe kompensiert (Cleland, 1994). Bei Maiswurzeln wurde ein Stufengradient beobachtet, wobei an der Wurzeloberfläche die Sauerstoffkonzentration 20,6% betrug und im Zentrum der Wurzel nahe der Wurzelspitze auf 10% abfiel. Im Leitbündelgewebe der Wurzelhaarzone beträgt die Sauerstoffkonzentration nur noch 4-5% (Drew, 1997).

Einige Arten haben in Anpassung an feuchte und anaerobe Böden nahe der Wurzelspitze lignin- und suberinreiche Sekundärzellwände entwickelt, um sich vor dem radialen Verlust von Sauerstoff in das umgebende Medium zu schützen (Clark, 1981). Anaerobe Böden mit niedrigem Redoxpotential stellen einen starken Sauerstoffakzeptor dar.

Außerhalb des Wurzelgewebes treten anaerobe Bedingungen bei Keimungsprozessen (Bewley, 1994, Botha, 1992, Edelstein, 1995), überschwemmten Koeoptilen und Rhizomen (Armstrong *et al.*, 1994, Kennedy *et al.*, 1992), reduziertem Gasaustausch in großen Früchten und Speicherorganen (Ke *et al.*, 1995, Lushuk und Saltveit, 1991), sowie bei der Vereisung von Blättern auf (Andrews und Pomeroy, 1989, Gudleifsson, 1994).

Normoxia, Hypoxia, Anoxia

Die Beschreibung anaerober Zustände ist in der Literatur nicht immer einheitlich. Für diese Arbeit gilt daher folgende Terminologie: Hypoxische Sauerstoffkonzentrationen sind erreicht, wenn die ATP Bildung durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien limitiert wird. Anoxia beschreibt den Zustand, an dem die ATP-Bildung in den Mitochondrien im Vergleich

zu der ATP Bildung durch Glykolyse und Fermentation vernachlässigbar ist. Normoxia beschreibt den Zustand unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen. Die mitochondriale ATP Bildung ist nicht durch Sauerstoffmangel limitiert.

Zelluläre Schäden durch Anaerobiose

Alle Zellen sind in der Lage einige Stunden ohne Sauerstoff zu überleben. In metabolisch sehr aktiven Zellen reicht der ATP Gehalt für ca. 1-2 Minuten (Roberts *et al.*, 1984a; Roberts *et al.*, 1984b). Danach kompensieren Glykolyse und Fermentation die ATP Defizite. Auf subzellulärer Ebene führt dies zu einem Anschwellen der Mitochondrien schon nach wenigen Minuten der Anaerobiose (Aldrich *et al.*, 1985; Andreev *et al.*, 1991). Die Veränderungen der Feinstruktur sind reversibel, wenn wieder ausreichende Mengen an O₂ vorhanden sind (Andreev *et al.*, 1991). Allerdings schädigen Inkubationen die länger als 15h andauern die Mitochondrialstruktur, den Energiemetabolismus und die Zellvitalität irreversibel. Die Ursachen hierfür können zum einen an der mangelnden Verfügbarkeit von Substraten für die Glykolyse oder aber an der Intoleranz gegenüber bestimmten Stoffwechselendprodukten der Glykolyse und Fermentation liegen. Hohe Konzentration an Zuckern insbesondere an Fruktanen während der Anaerobiose stellen den Ablauf der Glykolyse sicher, so dass irreversible Schäden durch mangelndes Substrat hier nicht die Ursache darstellen. Allerdings wird in Sink-Geweben, wie beispielweise der Wurzelspitze, Saccharose schnell dissimiliert ohne dass dieser Verlust durch Assimilattransport aus den Source-Geweben kompensiert wird. Hier ist speziell die Entladung des Phloems in den Sink-Geweben durch Anaerobiose inhibiert (Waters *et al.*, 1991a; Saglio, 1985). Die externe Zugabe von Glukose ins Medium kann die Vitalität der Wurzeln durch starkes Ansteigen der Fermentationsraten und des Energiestoffwechsels gegenüber anaeroben Bedingungen verbessern (Waters *et al.*, 1991a; Zitomer und Lowry, 1992) und sogar die normale Mitochondrialstruktur (Vartapetion *et al.*, 1977) erhalten .

Bedeutsamer ist allerdings die Veränderung des cytosolischen pH-Wertes während der Anaerobiose. Während der Adaption der Zelle an anaerobe Bedingungen ändert sich die Dissimilation der Saccharose von der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien zur Fermentation im Cytoplasma, wobei nun Pyruvat zu Lactat reduziert wird (siehe Abb. 1). Durch diese Umstellung fällt der pH Wert nach ca. 20 Minuten von anfänglich 7,3–7,4 auf

6,8. Die pH abhängige Regulation von LDH und PDC ermöglicht dann ein Umschalten auf die alkoholische Fermentation. Ein pH Wert von < 7 inhibiert die LDH und aktiviert die PDC. Ein weiteres Absinken des cytosolischen pH-Wertes kann bei andauernder Anaerobiose durch den Verlust des Protonengradienten in den Vakuolen auftreten. Mangels ATP können die Protonen translozierenden ATPasen des Tonoplasten den Gradienten (pH 5,8 in der Vakuole) nicht mehr aufrecht erhalten und es kommt zu einer passiven Entleerung in das Cytoplasma. Der Grad der Acidifizierung steht damit in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Zelltod.

Mais Mutanten, deren Alkoholdehydrogenase (*Adh1*) mutiert ist und die nur eingeschränkte Glykolyse und Fermentation durchführen können, zeigen einen sehr viel schnelleren Verlauf der cytoplasmatischen Acidität im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Fan *et al.*, 1988; Saint-Ges *et al.*, 1991). Ähnliches wurde in Wurzelhaaren von *Medicago sativa* und Wurzeln von Weizen beobachtet (Felle, 1996; Menegus *et al.*, 1989). Untersuchungen am Sproß von Reispflanzen zeigen zunächst eine Abnahme des pH-Wertes von 7,4 auf 7,0. Allerdings folgt darauf eine Alkalisierung der Vakuole und des Cytoplasmas.

Angesichts dieser Evidenzen scheint die Regulation des pH-Wertes wichtig für das Überleben der Zellen unter anaeroben Bedingungen. Bei *Limonium* Arten, die als äußerst tolerant gegenüber anaeroben Bedingungen eingestuft werden, wird während der gesamten Dauer der Anaerobiose Lactat produziert, welches effektiv ins umgebende Medium abgesondert wird (Rivoal und Hanson, 1993). Ähnliches wurde in älteren, vakuolisierten Wurzelgeweben aus Mais beobachtet (Drew, 1997).

Mechanismen, die anaerobem Streß entgegenwirken

Anoxia tolerante Pflanzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu anderen Pflanzen erheblich längere anaerobe Perioden überleben. Abgesehen davon, dass jede Pflanze einen gewissen Zeitraum der Anaerobiose schadfrei überleben kann, haben diese Spezialisten in Adaption an ihre Umwelt bestimmte metabolische Mechanismen entwickelt. Meist betreffen solche Adaptionen nur Pflanzenorgane und seltener die gesamte Pflanze. Biochemische Grundlage aller Adaptionen ist die Gewährleistung anhaltender Glykolyse zur Sicherstellung von Energieäquivalenten. Die Regeneration von NAD aus NADH durch die Fermentation verhindert, dass die Glykolyse zum Erliegen kommt. Außerdem müssen die Stoffwechselendprodukte zellverträglich oder leicht in externe Medien abzuführen sein. Die

Netto ATP Ausbeute beträgt 2mol pro mol Glukose und erhöht sich bei Stärke als Ausgangsmolekül auf 3mol. NAD wird für die Oxidation von 3-Phosphoglyceraldehyd zu 3-Phosphoglycerat reduziert und anschließend durch die Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol bzw. von Pyruvat zu Lactat wieder regeneriert (vergl. Abb.1).

Besonderheiten anaerob toleranter Organe leiten sich von diesen Überlegungen ab: Zur Vermeidung cytosolischer Acidosis wird schnell und anhaltend auf ethanolische Fermentation umgestellt (Armstrong *et al.*, 1994; Bertani *et al.*, 1980; Bucher und Kuhlemeier, 1993; Duss und Brändle, 1982) und gewährleistet, dass entweder durch Abgabe in externe Medien (Bertani *et al.*, 1980; Duss und Brändle, 1982; Monk *et al.*, 1984) oder den Transpirationsstrom (MacDonald und Kimmerer, 1993) überschüssiges Ethanol abgegeben wird. Erhöhte Aktivität der Stärke Phosphorylase führt zu einer besseren ATP Ausbeute unter anaeroben Bedingungen (Steinmann und Brändle, 1984). Bei *Echinochloa phyllopogon* ist unter anaeroben Bedingungen sogar noch Wachstum möglich. Energetisch kann dies kaum die Fermentation allein bewältigen. Es wird in diesem Zusammenhang die ATP Generierung durch einen teilweise intakten Tricarbonsäure Zyklus (TCA) im Zusammenspiel mit dem oxidativen Pentosephosphatweg und der Fettsäuresynthese für die Reduktion von NADH zu NAD diskutiert (Fox *et al.*, 1994).

Im Zusammenhang mit anaeroben Bedingungen wurde die Anreicherung von Succinat und GABA (γ -Aminobuttersäure) beobachtet. Zur Zeit ist noch nicht klar, inwieweit diese Metaboliten eine Rolle innerhalb anaerob toleranter Organe spielen könnten. Hier wird eine Stabilisierung des cytoplasmatischen pH-Wertes vermutet. Ebenso unklar ist die Bedeutung der Akkumulation von Alanin in Wurzelgeweben unter anaeroben Bedingungen, da hier kein Einfluß auf den Energiestoffwechsel oder die Regulierung des cytosolischen pH-Wertes erkennbar ist.

Ein wichtiger Aspekt in Hinblick auf die cytosolische Acidifizierung ist die Energetisierung der H^+ -ATPasen im Tonoplasten vakuolisierter Zellen. Anaerobiose induziert in Reiskeimlingen eine 75-fache Aktivitätssteigerung der V-PPasen (Pyrophosphat (PPi)-abhängige Protonenpumpen im Tonoplasten) (Carystinos *et al.*, 1995). Die Konzentration von PPi ist unabhängig von dem ATP/ADP Verhältnis und könnte unter Bedingungen des ATP Mangels die Energetisierung der Vakuolen kompensieren. Ein weiterer Hinweis auf den Ersatz von ATP durch PPi ist die PPi abhängige Fru-6-P Phosphokinase, deren Aktivität unter anaeroben Bedingungen steigt und den Verlust der ATP abhängigen Phosphofruktokinase in der

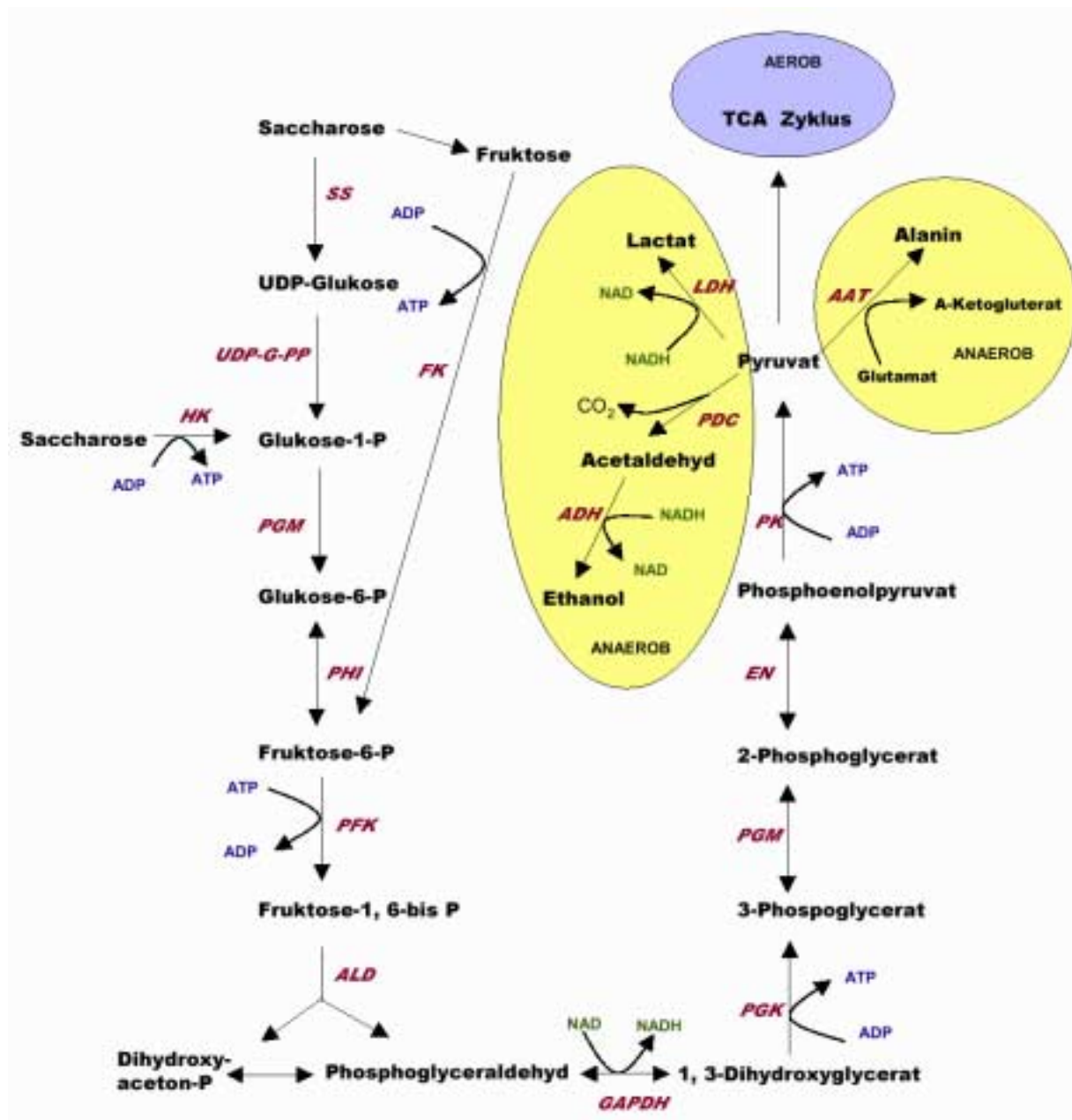


Abb. 1: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege zur Energiegewinnung unter aeroben und anaeroben Bedingungen (nach (Drew, 1997) verändert). Die Darstellung beschränkt sich auf die Glykolyse und die unter anaeroben Bedingungen einsetzende Fermentation, sowie die Synthese von Alanin als prominentes Produkt anaerober Synthese. ATP-Synthese und NAD Regeneration sind ebenfalls eingezeichnet. UDP-G-PP, UDP-Glukose-Pyrophosphorylase; PG, Phosphoglukomutase; GK, Glukosekinase; HK, Hexokinase; PHI, Phosphohexose Isomerase; FK, Fruktokinase; PFK, Phosphofruktokinase; ALD, Aldolase; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase; PGK, Phosphoglyceratkinase; PGM, Phosphoglyceratmutase; EN, Enolase; PK, Pyruvatkinase; AAT, Alaninaminotransferase; LDH Lactatdehydrogenase; PDC, Pyruvatdecarboxylase; ADH, Alkoholdehydrogenase.

Glykolyse kompensieren kann (Mertens *et al.*, 1990). Außerdem steigt bei fallendem pH-Wert die freie Energie der Hydrolyse von PPi, während sie bei ATP sinkt (Davies *et al.*, 1993). Trotzdem bleibt der Einfluß von PPi während lang andauernder Phasen der Anaerobiose fraglich, da nur geringe Reserven bestehen, die ohne Regenerationsmechanismen schnell verbraucht wären (Drew, 1997).

Anpassung an anaerobe Bedingungen

In der Regel erfolgt die Transition von aeroben zu anaeroben Bedingungen nicht plötzlich, sondern eher in einem Prozeß langsam fortschreitenden Sauerstoffentzugs. Die Vitalität langsam angepaßter Pflanzen im Vergleich zu solchen, die sofort anaeroben Bedingungen ausgesetzt werden, ist deutlich größer (Johnson *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1994; Saglio *et al.*, 1988; Waters *et al.*, 1991b; Xia und Roberts, 1994). Hypoxische Akklimatisierung ermöglicht der Pflanze auf die neuen Bedingungen zu reagieren, in dem sie den langsamen Anstieg der Transkription anaerober Gene induziert. Im Vergleich dazu werden unter sofortigen anaeroben Bedingungen zwar auch diese Gene induziert, die nach etwa 6 h ihr Transkriptionsmaximum zeigen, danach allerdings im Gegensatz zu hypoxisch akklimatisierten Pflanzen herunter reguliert werden (Andrews *et al.*, 1993; Andrews *et al.*, 1994a; Andrews *et al.*, 1994b). Im unmittelbaren Zusammenhang damit steht die bessere Versorgung akklimatisierter Pflanzen mit ATP und eine anhaltende Ethanolfermentation (Johnson *et al.*, 1989; Saglio *et al.*, 1988). Effizienter Lactatexport in akklimatisierten Pflanzen wird ebenfalls beobachtet (Xia und Roberts, 1994; Xia und Saglio, 1992). Zusammenfassend wird durch allmähliche Akklimatisierung der Pflanzen an anaerobe Bedingungen die ATP Bildung durch anhaltende Glykolyse in Verbindung mit ethanolischer Fermentation effizienter ermöglicht und eine toxische Acidifizierung des Cytosols durch Lactatsynthese mit induzierten Transportmechanismen verhindert.

Postanoxische Akklimatisierung

Die Vitalität anaerob gestreßter Zellen hängt nicht nur von der Adaption der Glykolyse an sauerstoffarme Bedingungen ab, sondern ebenso von intakten Schutzmechanismen gegen

Sauerstoffradikale nach Rücküberführung in aerobes Milieu. Superoxiddismutase (SOD) reduziert Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das von Peroxidasen oder Katalasen weiter zu H_2O reduziert wird. Am Beispiel von Wurzelspitzen der Sojabohne konnte gezeigt werden, dass Zellschäden nach kurzer anaerober Induktion (1-2h) mit der Verringerung der SOD mRNA korrelieren. Nach längeren anaeroben Inkubationszeiten (5h) nimmt die Transkriptionsrate der SOD wieder zu und die Vitalität steigt. Gleiche Effekte konnten beobachtet werden, wenn dem Inkubationsmedium Ascorbat als freier Radikalfänger hinzugegeben wurde (Van Toai und Bolles, 1991). In Wurzeln aus hypoxisch inkubierten Weizenkeimlingen wurden erhöhte Mengen an Gluthation (GSH) nachgewiesen, die 20 Min. nach Reoxigenierung oxidiert vorlagen (Albrecht und Wiedenroth, 1994). Es scheint daher für die Vitalität der Pflanzen nach dem Übergang von anaeroben zu aeroben Bedingungen wichtig zu sein, neben einer effizienten Glykolyse und Fermentation ebenfalls Schutzmechanismen für die Abwehr entstehender Sauerstoffradikale bereitzuhalten.

Anaerobe Genexpression und Proteinsynthese

Anaerobiose ändert das unter aeroben Bedingungen vorliegende Genexpressions- und Translationsprofil. In Wurzeln von Maiskeimlingen wird die Proteinsynthese der meisten Gene gedrosselt, wobei eine Klasse bestehend aus ca. 20 Proteinen („anaerobe Proteine“: ANP) bevorzugt exprimiert wird (Sachs *et al.*, 1980). Die Genregulation erfolgt auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene (Rowland und Strommer, 1986; Sachs *et al.*, 1996; Bailey-Serres und Freeling, 1990; Fennoy und Bailey-Serres, 1995; Fennoy *et al.*, 1998). Grundlage selektiv bedingter Translation ist die wachsende Anzahl nicht translatierender Ribosomen, was sich in der Dissoziation von Polysomen in Monosomen bereits 1 h Stunde nach anaerober Induktion manifestiert und mit fortlaufender Inkubation zunimmt. Begleitet wird dieser Prozeß durch eine ansteigende Zahl kleiner Polysomen (Bailey-Serres und Freeling, 1990) an denen selektiv mRNA's von ANPs translatiert werden (Fennoy und Bailey-Serres, 1995; Fennoy *et al.*, 1998). Anaerobiose über einen Zeitraum von 5h führt zu einer Akkumulation der ANPs von etwa 70% relativ zum Gesamtproteinanteil. Die meisten ANPs konnten aus Mais kloniert werden und sind häufig Enzyme der Glykolyse und der Fermentation. Zu ihnen gehören die Alkoholdehydrogenasen *Adh1* und *Adh2* (Sachs, 1980), Lactatdehydrogenase *Ldh*, Sucrose Synthase *Sh1* und *Sus1* (Springer *et al.*, 1986;

McCarty *et al.*, 1986), Aldolase *Ald* (Kelley und Freeling, 1984a; Dennis *et al.*, 1988b), Glucose-6-Phosphatisomerase *Gpi* (Kelley und Freeling, 1984b), Pyruvatdecarboxylase *Pdc* (Laszlo und St. Lawrence, 1983), Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase *Gpc* (Russell und Sachs, 1989; Russell und Sachs, 1991; Manjunath und Russel, 1997), Enolase *En* und Phosphoglyceratmutase (Bailey-Serres *et al.*, 1988). Eine Ausnahme nicht glykolytischer ANPs ist ein Xyloglucan-endo-transglycosylase Homolog aus Mais. Seine Funktion im Rahmen der Anaerobiose könnte die Zellwanddegradation zur Schaffung aerenchymatischer Poren sein (Sachs *et al.*, 1996).

Die Selektivität bestimmter mRNA's kann durch *cis*-Elemente in der mRNA oder durch anaerob-spezifische Modifikationen an den Ribosomen, bspw. durch Phosphorylierung, erfolgen (Bailey-Serres und Dawe, 1996). Hierbei sind Initiierungs- und Postinitiierungsprozesse der Translation an den Ribosomen gleichermaßen betroffen (Bailey-Serres *et al.*, 1997; Fennoy *et al.*, 1998).

Zumindest für einige dieser ANPs konnte unter anaeroben Bedingungen gleichzeitige Induktion gezeigt werden (Sachs *et al.*, 1996), obwohl sich die Transkriptionsraten organspezifisch und in Stärke und Kinetik unterscheiden (Andrews *et al.*, 1994b). Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise gemeinsame regulatorische *cis*-Elemente in den Promotoren dieser Gene vorhanden sind.

Allgemein bestehen Promotoren aus verschiedenen *cis*-Elementen an die spezifisch Transkriptionsfaktoren binden. Sie sind modular aufgebaut und enthalten eine Initiierungsstelle und in den meisten Fällen eine TATA-Box. Die Initiierungsstelle ist eine pyrimidinreiche Sequenz am Transkriptionsstartpunktes. Um die TATA Box bildet sich der Prä-Initiierungskomplex (PIC). Dieser ist aus generellen Transkriptionsfaktoren wie TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF und TFIIH, die als Komplex die RNA-Polymerase binden, aufgebaut. Durch die generellen Transkriptionsfaktoren wird die Polymerase innerhalb des PIC entlang der DNA ausgerichtet und ein exaktes Ablesen der DNA Matrize ermöglicht (Roeder, 1991). Der Transkriptionsfaktor TFIID besteht aus dem TATA Box bindenden Protein TBP und daran assoziierten Faktoren (TAFs), deren Zusammensetzung innerhalb verschiedener TFIIDs variieren kann. (Chang und Jaehning, 1997). Zwischen dem Prä-Initiierungskomplex und den *cis* Elementen im Promotor kann es zur direkten und indirekten (über Mediatoren) Interaktion kommen, wobei die Chromatinstruktur dahingehend beeinflusst wird, dass die Polymerase effizienter innerhalb des PIC gebunden werden kann. Dies hat eine erhöhte Transkriptionsfrequenz des DNA Abschnitts durch RNA Polymerase zur Folge.

Einige weit verbreitete *cis* Elemente sind die CAAT Box und die GC Box, die in einem Bereich zwischen -110 und -40 relativ zum Transkriptionsstartpunkt häufig gefunden werden. Neben diesen allgemeinen Promotorelementen existieren „Response Elemente“ (RE), die eine spezifische Promotoraktivität vermitteln. Bestimmte Bedingungen, bspw. Streß durch Anaerobiose, führen zur Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese Elemente oder modifizieren bereits daran gebundene, sodass eine gezielte Genregulation ermöglicht wird.

Ein Beispiel für die streßinduzierte Transkription ist das unter anaeroben Bedingungen induzierte Alkoholdehydrogenasegen *Adh1* aus Mais. Im Promotorbereich dieses Gens wurde ein *cis*-regulatorisches Element identifiziert, das ARE (Anaerobe Response Element), welches die anaerobe Induktion vermittelt (Howard *et al.*, 1987; Walker *et al.*, 1987). Das ARE Element ist 40bp lang und besteht aus 2 funktionellen Bereichen, die durch ein 10 bp langes Fragment getrennt werden. Innerhalb der funktionellen Bereiche befinden sich zwei GC Motive und zwei GT-Motive (Olive *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1987). Das GC-Motiv wird von dem Kernfaktor GCBP-1 erkannt (Olive *et al.*, 1991) und an das GT-Motiv bindet der Kernfaktor ARF-B2 (Ferl, 1990). *In vivo* Footprinting Experimente zeigen noch zusätzliche Proteininteraktionsstellen, die außerhalb des AREs im *Adh1* Promotor liegen (Paul und Ferl, 1991). Gemeinsam für einige geschützte Bereiche ist das GTGG Motiv, alternativ auch als halbe G-Boxen bezeichnet. Kompetitive Gel-Shift Experimente zeigen Bindungsaffinität eines hypoxisch induzierten G-Box Proteins (GBF1) aus Mais an solche halben G-Boxen (de Vetten und Ferl, 1995). G-Box bindende Proteine (GBF) sind Transkriptionsfaktoren der Klasse basischer Leucin Zipper Proteine (bZIP), die als Dimer an DNA-Sequenzen binden (Kern-Consensusmotiv: ACGT; Foster *et al.*, 1994). Mutationen in der G-Box reduzieren die Promotoraktivitäten in einigen licht- und streßinduzierten Genen (Donald und Cashmore, 1990; McKendree und Ferl, 1992; Schulze-Lefert *et al.*, 1989; Dolferus *et al.*, 1994). Halbe und intakte G-Boxen, die funktionell bedeutsam sind, wurden auch im *Adh* Promotor aus *Arabidopsis* gefunden und durch *in vivo* Footprints wurde gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren binden (DeLisle und Ferl, 1990; Ferl und Laughner, 1989; McKendree *et al.*, 1990). Interessanterweise bindet ein Proteinkomplex an diese G-Box, der aus einem GBF und einem 14-3-3 Homolog besteht (Lu *et al.*, 1992). 14-3-3 Proteine können phosphoryliert werden und binden Ca^{2+} (Lu *et al.*, 1994b). Intrazellulärer Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels gilt als frühes Zellsignal auf anaeroben Bedingungen (Subbaiah *et al.*, 1994a; Subbaiah *et al.*, 1998; Subbaiah *et al.*, 1994b). 14-3-3 Proteine könnten also als Glied in der Ca^{2+} abhängigen Signaltransduktionskette fungieren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass

14-3-3 Proteine mit dem TFIID und TFIIB Komplex, die sich im Bereich der TATA-Box manifestieren, interagieren. Dabei funktioniert das 14-3-3 Protein als Aktivator (Pan *et al.*, 1999).

Die Bedeutung des ARE Elements im Hinblick auf anaerobe Induktion wird durch Homologien von Promotorelementen anderer anaerob induzierter Gene unterstützt. ARE homologe Sequenzen wurden in Promotoren der Maisgene Aldolase (Dennis *et al.*, 1988; Hoeren *et al.*, 1998), Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (Köhler *et al.*, 1995) und Lactatdehydrogenase (Good und Paetkau, 1992; Hoeren *et al.*, 1998), sowie im 1. Intron der Sucrose Synthase gefunden (Springer *et al.*, 1986). Abgesehen von den monokotyledonen Pflanzen findet man das Element auch in anaerob funktionellen Bereichen verschiedener dikotyledoner Pflanzen. In *Arabidopsis* und Erbse befinden sich ARE homologe Sequenzen in den Promotoren der Alkoholdehydrogenasen (Dolferus *et al.*, 1994; Llewellyn *et al.*, 1987; Hoeren *et al.*, 1998). Trotzdem ist das alleinige Vorhandensein des ARE Elements kein ausreichender Hinweis auf eine anaerobe Induktion. Der *GapC1* Promotor aus Mais zeigt hohe Homologie zum ARE, ist aber aerob aktiv und nicht anaerob induzierbar. Er unterliegt sogar anaerober Repression (Martinez *et al.*, 1989). Offensichtlich entscheidet das ARE nicht alleine über die Genexpression, sondern im Kontext mit der Promotorumgebung.

Der *GapC4* Promotor als Modellsystem zur Identifizierung anaerob spezifischer *cis*-Elemente und *trans* Faktoren in heterologen Pflanzen

In dieser Arbeit soll ein grundsätzlicher Beitrag dazu erbracht werden, wie anaerobe Promotoren funktionieren. Hierbei geht es in erster Linie darum, welche Module im Promotor anaerobe Induktion vermitteln, um in einem zweiten Schritt die gewonnenen Erkenntnisse in einem „Optimalpromotor“ umzusetzen. Dieser Promoter ermöglicht dann den biotechnologischen Einsatz, möglicherweise über Artengrenzen hinaus. Ein gutes Modellsystem dafür ist der *GapC4* (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) Promotor aus Mais (Köhler *et al.*, 1995; Manjunath und Sachs, 1997). Im Gegensatz zum *Adh1* Promotor, der in transgenen Tabakpflanzen erst nach Insertion eines Octopinsynthase Enhancer (*ocs*) 10 bis 20-fach anaerob induzierbar ist (Ellis *et al.*, 1987), zeichnet sich der *GapC4* Promotor durch anaerob spezifische, starke und ubiquitäre Induktion aus. Die spezifische Induktion einiger transgener Tabakpflanzen liegt dabei mehr als 1000-fach über unspezifischen

Hintergrund. In einigen Fällen ist die anaerob vermittelte Expression des GUS Reportergens höher als die durch den CaMV 35S Promotor des Blumenkohlmosaik Viruses (Köhler *et al.*, 1996). Neben der streng anaerob spezifischen Induktion - aerobe Reportergenexpression wurde selten beobachtet - wirken nur noch Verwundung und UV-Licht relativ zur anaeroben Induktionsrate schwach induzierend (Köhler *et al.*, 1996). Unter allen bisher untersuchten anaeroben Promotoren (Dolferus *et al.*, 1994; Ellis *et al.*, 1987; Köhler *et al.*, 1996; Kyoizuka *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1993) sind diese Eigenschaften einzigartig und qualifizieren den *GapC4* Promotor als gutes System zum Studium anaerob spezifischer *cis*-Elemente im heterologen Pflanzensystem.

Die *GapC* Genfamilie in Mais

Im Mais existieren neben der *GapC4* noch drei weitere cytosolische GAPDH's die zu einer Genfamilie gehören: *GapC1* und *GapC2* werden ubiquitär und konstitutiv exprimiert, während *GapC3* vorwiegend in Wurzeln und Sproß, nicht aber in Blättern vorkommt. Homologieuntersuchungen zeigten, dass *GapC1* und *GapC2*, bzw. *GapC3* und *GapC4* enger mit einander verwandt sind als die Gruppen untereinander. Unter anaeroben Bedingungen kommt es bei *GapC1* und *GapC2* zu einer Reduktion der Transkription, während die von *GapC3* und *GapC4* ansteigt (Russel, 1989; Russell und Sachs, 1992; Martinez *et al.*, 1989; Kersanach *et al.*, 1994; Manjunath und Sachs, 1997). Gewebespezifische Expressionsprofile für *GapC4* im Mais fehlen, allerdings wurden in den Wurzeln von Maissämlingen hohe Transkriptionsraten gemessen (Manjunath und Sachs, 1997). Im heterologen Tabaksystem ist die Expression ubiquitär (Köhler *et al.*, 1996).

Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Kartierung anaerob spezifischer *cis*-Elemente im *GapC4* Promotor aus Mais in Tabak. Im Hinblick auf die Funktionalität des *GapC4* Promotors im heterologen Pflanzensystem, liegt ein besonderer Schwerpunkt in der Charakterisierung solcher *cis*-Elemente, die auch in einer heterologen genetischen Umgebung aktiv sind.

Transgene Tabakpflanzen, die Deletionskonstrukte des *GapC4* Promotors vor dem GUS Reportergen tragen, werden hinsichtlich ihrer Expressionsstärke untersucht.

In einem zweiten Schritt soll nach der Identifizierung potentieller *cis*-Elemente, die Funktionalität des einzelnen Elementes im Vergleich zum Gesamtpromotor untersucht werden. Feinere Kartierung der *cis*-Elemente wird in transienten und transgenen Expressionsstudien vorgenommen.

Zusätzlich soll in einem dritten Schritt die spezifische Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit den *cis*-Elementen untersucht werden.

Letztendlich leistet die vorgelegte Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Regulation des anaerob spezifischen *GapC4* Promotors im heterologen Tabaksystem, besonders im Hinblick auf die Identifizierung wichtiger Nukleotidsequenzen, die essentiell für die anaerob spezifische Regulation sind. Erweitert werden die Erkenntnisse auch im Hinblick auf die interagierenden Kernfaktoren des ARE Elementes und der TATA Box. Im Sinne der allgemeinen Promotorkonstruktion wird in dieser Arbeit ein weiteres Promotormodul definiert, welches im heterologen System, und damit auch als Perspektive für mögliche biotechnologische Anwendung, ubiquitäre, anaerob spezifische Expression vermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterien- und Hefestämme

Escherichia coli:

INVαF' F' *endA1 recA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*
 $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 \lambda^-$
 XL1-Blue MRF' $\Delta(mcrA)183 \Delta mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1*
gyrA96 relA1 lac [F' *proAB lacI^qZ*ΔM15 Tn10 (Tet^r)]
 KC8 (Kim *et al.*, 1997)

Agrobacterium tumefaciens

C58C1 (EHA101) (Hood *et al.*, 1986)

Saccharomyces cerevisiae:

YM 954 (Kim *et al.*, 1997)
 SFY526 MATa, *ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp 1-901, leu2-3, 112,*
can^r, gal4-542, gal80-538, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

2.2 Plasmide

Plasmid	Art / Merkmal	Referenz
pGUS3	GUS-Gen	(Köhler <i>et al.</i> , 1995)
pCR2.01	TA Klonierungsvektor	Invitrogen, TA Cloning Kit
pRT99	CaMV 35S::GUS	(Köhler <i>et al.</i> , 1995)
pRT101	CaMV 35S::GUS	(Töpfer <i>et al.</i> , 1988)
pRT101LUC	CaMV 35S::LUC	(Töpfer <i>et al.</i> , 1988)
pBSK +/-	Phagemid	Stratagene
pPC86	cDNA Vektor für OHS	(Kim <i>et al.</i> , 1997)
pOCA28	binärer Transformationsvektor	(Olszewski <i>et al.</i> , 1988, Honma <i>et al.</i> , 1993)
pYC7	Reporterplasmid OHS, lacZ	(Kim <i>et al.</i> , 1997)
pSK1	Reporterplasmid OHS, HIS3	(Kim <i>et al.</i> , 1997)
pCL1	<i>gal4</i> -Gen	(Fields, 1989)

2.3 Allgemeine Methoden

DNA Extraktion aus *E. coli*, Restriktionsverdau, Fragmentelution, DNA modifizierende Methoden (Phosphorylierung, Dephosphorylierung, Auffüllen überstehender Enden, Ligationen), Gelelektrophorese, Anzucht von *E. coli* Zellen, Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und deren Plasmidtransformationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. mit entsprechenden KIT-Systemen durchgeführt. DNA Sequenzierungen erfolgten mit der Kettenabbruchmethode nach (Sanger *et al.*, 1977) mit der Modifikation von Hsiao (1991) und wurden im A.L.F. Sequencer gelesen.

2.4 Enzymsysteme und Kits

Kit / Enzymsystem	Verwendungszweck	Hersteller
QIAEx II	DNA-Elution aus Agarose Gel	Qiagen CAT.NO.20021
Oligotex TM Direkt mRNA Kit	mRNA Isolierung	Qiagen CAT.NO.#72041
QIAprep	Plasmidpräparation (Mini)	Qiagen CAT.NO.#27104
Jet Star	Plasmidpräparation (Maxi)	Jet Star
AutoRead TM Sequencing Kit	DNA Sequenzierung	Pharmacia LOT No 4031690042
Anaerocult	Anaerobiose	Merck
Klenow Enzym	DNA Markierung	Gibco BRL CAT.NO.18012-021
SUPERScript TM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning	cDNA Synthese, cDNA Klonierung	Gibco BRL, CAT.NO.18248-013
cDNA Synthesis Kit ZAP Express TM Predigested Vektor Kit ZAP Express TM Predigested Gigapack [®] III Gold Cloning Kit	cDNA Synthese cDNA Klonierung Verpackungsextrakte	Stratagene CAT.NO.#200401 CAT.NO.#239213 CAT.NO.#239616
Taq-Polymerase	PCR	Appligene-Oncor CAT.NO.120186A
TA-Cloning Kit	Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen CAT.NO.K2000-01

2.5 Extraktion von Nukleinsäuren

2.5.1 RNA

(Pahnke, pers. Mitteilung)

4g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff fein zermörkert und in 25 ml 65°C warmen Extraktionspuffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, 2 M NaCl, 8% Polyclar AT) aufgenommen. Unmittelbar nach dem Auftauen des Material wurden 2 Vol % 0,14M β -Mercaptoethanol hinzugegeben. Bei 4000xg in der Kühlzentrifuge und 4°C wurden die Zelltrümmer 5 Min. pelletiert. Der Überstand wurde 2x mit 1 Volumen Phenol-Chloroform (1:1 v/v) extrahiert und bei 4000xg, 4°C für 1 Min. zentrifugiert. Die Oberphase war nun klar. Langsam wurden 0,5 Volumina abs. Ethanol zugegeben und mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) 1 Min. extrahiert. Die ausgefallenen Polysaccharide wurden bei 4°C im GSA Rotor bei 7000 Upm 10 Min. abzentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und $\frac{1}{4}$ Volumen 10M LiCl zugegeben. RNA präzipitierte bei 0°C in 2-3h oder über Nacht. Anschließend wurde im SS34 Rotor 30 Min. bei 4°C in der Kühlzentrifuge die präzipitierte RNA pelletiert (im Überstand befand sich die DNA). Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet in 500 μ l vorgewärmten SSTE-Puffer (1M NaCl, 0,5% SDS, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA; 40-50°C) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß (1,5ml) überführt. Es wurden 2 Volumen eiskalter, absoluter Ethanol zugegeben und die RNA erneut bei -80°C 45 Min. gefällt. Die RNA wurde bei 17000 Upm in der Heraeus Tischkühlzentrifuge 20 Min. pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und abschließend in 200 μ l DEPC behandelten H₂O aufgenommen. Die Konzentration wurde im Photometer bei 260 nm bestimmt. Das Verhältnis der Extinktion bei 260nm und 280nm sollte für saubere RNA 2:1 betragen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.5.2 mRNA

Aus 800 μ g Gesamt-RNA wurde PolyA⁺mRNA extrahiert. Dabei wurden von der Firma Qiagen „Oligotex“-Partikel verwendet (siehe 2.4). Bei der Isolierung der mRNA wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. An die Oligotex-Partikel sind poly-Thymidin-Oligonukleotiden gebunden, die unter Hochsalzbedingungen mit dem PolyA-Schwanz der eukaryotischen mRNA hybridisierten. Selektives Binden der mRNA-Moleküle an diese Partikel ermöglichte ein Abtrennen der nicht gebundenen RNA. Abschließend wurden die

mRNA Moleküle von den Oligotex-Partikeln unter Nidrigsalzbedingungen abgetrennt und eluiert.

2.6 PCR

2.6.1 *in vivo* PCR

Die Integration von Fremd-DNA in das bakterielle Plasmid (*E. coli*), sowie die richtige Orientierung, wurden durch *in vivo* PCR überprüft. Mehrere Kolonien wurden einzeln mit dem Zahnstocher von der Selektionsplatte abgenommen und damit jeweils ein einfacher PCR-Ansatz und eine ÜN-Kultur angeimpft.

Einfacher PCR-Ansatz (20 µl): 2 µl 10x PCR-Puffer (200mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,01% (w/v) Gelatin), 2µl 10 mM dNTP's, 1µl 20µM Primer A, 1µl 20µM Primer B, 0,2µl *Taq*-Polymerase (5u/µl; Appligene) mit dest. H₂O auf 20µl auffüllen.

Für die Amplifikation ist folgendes Programm eingesetzt worden:

1 Zyklus bei 94°C für 10 Min. DNA denaturieren.

30 Zyklen je 94°C für 30 Sek. denaturieren, 1 Min. bei 50°C Primer hybridisieren, 1 bis 5 Min. bei 72°C polymerisieren (abhängig vom erwarteten PCR-Produkt).

1 Zyklus Elongation bei 72°C für 10 Min.

2.6.2 *in vitro* PCR

Für die Herstellung der Promotordeletionen und für die Amplifikation der cDNA aus dem OHS-Plasmid pPC86 wurde *in vitro* PCR eingesetzt. Im wesentlichen liegen dafür die Angaben der *in vivo* PCR zugrunde. Allerdings wurde der PCR Ansatz auf 50 µl extrapoliert und 50-100 ng DNA eingesetzt. Das PCR Programm lief nach den in Absatz 2.6.1 vorgegebenen Parametern, wurde aber nach Fragmentlänge und Primereigenschaften variiert.

2.7 Untersuchungen an transgenem Tabak

2.7.1 *GapC4* -Promotordeletionen

Für die Herstellung der Promotordeletionen wurden Oligonukleotide synthetisiert, die an den entsprechenden Deletionsendpunkten des *GapC4* Promotors ansetzten. Im folgenden sind die Primer für 5' bzw. 3'Deletionen aufgelistet. Die Deletionsendpunkte sind relativ zum

Transkriptionsstart angegeben (Position GapC4). Außerdem wurden den Primern Linker mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung angefügt (siehe 2.7.1.3.2 und 2.7.1.3.3).

2.7.1.1 5'Deletionsprimer:

Forward:

EcoRI-Site

F1:	5'TTT GAA TTC AAT CAG ACA CCC ACC 3'	Position <i>GapC4</i> : -447
F2:	5'TTT GAA TTC AAC CAG CTC GGC CGA 3'	Position <i>GapC4</i> : -386
F3:	5'TTT GAA TTC CGA AAC CAG CAA CGG 3'	Position <i>GapC4</i> : -286
F4:	5'TTT GAA TTC GGT TTC CAA GGT CCA 3'	Position <i>GapC4</i> : -266
F5:	5'TTT GAA TTC GGA AGC TTC TCG AAA 3'	Position <i>GapC4</i> : -236
F6:	5'TTT GAA TTC CCT CCG GGC CCC ACT 3'	Position <i>GapC4</i> : -196
F7:	5'TTT GAA TTC ACC CGC ACG TCC TCA 3'	Position <i>GapC4</i> : -176
F8:	5'TTT GAA TTC AAA CCA GGT TCC GCG 3'	Position <i>GapC4</i> : -136
F9:	5'TTT GAA TTC GCA ACC GCA GCC GCA 3'	Position <i>GapC4</i> : -086
F10:	5'TTT GAA TTC TTT TAT ATA TGG CCC 3'	Position <i>GapC4</i> : -046

Reverse:

ClaI-Site

R1:	5'TTT ATC GAT GAC GGG GTT 3'	Position <i>GapC4</i> : +014
-----	------------------------------	------------------------------

2.7.1.2 3'Deletionsprimer:

Reverse:

EcoRI-Site

R10:	5'TTT GAA TTC GGC TGC GGC TGC TGC 3'	Position <i>GapC4</i> : -086
R11:	5'TTT GAA TTC CGG CAA AAA TGG TGG 3'	Position <i>GapC4</i> : -136
R12:	5'TTT GAA TTC GAC AAG TGG GGC CCG 3'	Position <i>GapC4</i> : -176
R13:	5'TTT GAA TTC AGA AAC GCG ACC GGG 3'	Position <i>GapC4</i> : -196
R14:	5'TTT GAA TTC CAT TGG TCG GAA CGT 3'	Position <i>GapC4</i> : -236
R15:	5'TTT GAA TTC CTG GAC CGT TGC TGG 3'	Position <i>GapC4</i> : -266
R16:	5'TTT GAA TTC GGC CCA CCG GAA GTG 3'	Position <i>GapC4</i> : -286
R17:	5'TTT GAA TTC TTC GGC GGC CGT TGG 3'	Position <i>GapC4</i> : -386

Forward

PstI-Site

F1(PstI):	5'TTT CTG CAG TTC AAT CAG ACA CCC 3'	Position <i>GapC4</i> : -447
-----------	--------------------------------------	------------------------------

2.7.1.3 DNA Konstrukte

2.7.1.3.1 PCR-Fragmentklonierung in pCR 2.01

Die PCR-Produkte der einzelnen Primerpaarungen entsprechen 5' bzw. 3' verkürzten Promotorelemente. Deletionen vom 5' Ende des *GapC4* Promotors wurden mit den Primerpaarungen F1-F10 mit R1 und Deletionen vom 3'Ende mit den Primerpaarungen R10-R17 mit F1 (PstI) erzeugt. Die PCR-Promotorfragmente wurden danach mit dem TA Klonierungssystem in den pCR 2.01 Vektor subkloniert (Abb. 2A). Dabei ist dem Klonierungsvektor ein 3' überstehender Thymidinrest angehängt wurden, der mit einem Adenosinrest hybridisiert, der durch die *Taq*-Polymerase 5' an das PCR-Produkt angehängt wurde (TA Klonierungssystem, Invitrogen). Alle Promotorelemente wurden durch Sequenzierung und anschließendem Sequenzvergleich mit der Originalsequenz des *GapC4* Promotors bestätigt.

2.7.1.3.2 Klonierung der 5' deletierten Promotorelemente

EcoRI /ClaI Promotorfragmente wurden aus dem pCR 2.01 Vektor in den pGUS3 Vektor vor das β -Glucuronidase Reportergen (GUS) kloniert (Beispiel: Abb. 2B: p5'-461GUS). Das PvuII Promotor-Reportergen Fragment aus den pGUS3-Derivaten wurde anschließend in den Transformationsvektor pOCA28 kloniert, wobei in allen Konstrukten der Promotor proximal zur linken Bordersequenz (LB) liegt (siehe Abb. 2C).

2.7.1.3.3 Klonierung der 3' deletierten Promotorelemente:

Hier wurde zunächst ein EcoRI/ClaI Minimalpromotorfragment (Primerpaarung F10/R1), das die *GapC4* TATA Box enthält, aus dem pCR 2.01 Vektor vor das GUS Reportergen kloniert (p5'-60GUS) und dient als Grundlage für alle folgenden Klonierungsschritte. Die 3' deletierten Promotorelemente wurden als PstI/EcoRI Fragmente vor das Minimalpromotor-Reportergen in pGUS3 kloniert (Beispiel Abb. 2B: p3'-100GUS). Anschließend wurde analog zu den 5' deletierten Promotorfragmenten in den Transformationsvektor pOCA28 umkloniert (Abb. 2C).

2.7.1.3.4 Klonierung des ARE Fragments:

ARE_F-GUS

Das PvuII Promotor-Reportergen Fragment aus dem pGUS3-Derivat p1xARE-GUS (siehe 2.11.1) wurde in den Transformationsvektor pOCA28 kloniert, wobei der Promotor proximal zur linken Bordersequenz (LB) liegt.

ARE_R-GUS

Für die Klonierung des AREs in reverser Orientierung zum GUS-Reportergen wurde ebenfalls das SmaI/EcoRV ARE Fragment aus dem pCR-ARE S-B Vektor (siehe 2.9.2.1) geschnitten und in die aufgefüllte EcoRI Schnittstelle von p5'60GUS Vektor (siehe 2.7.1.3.3) vor den Minimalpromotor kloniert. Das ARE liegt in hier in reverser Orientierung relativ zum GUS-Reportergen vor (p1xARE_R-GUS). Das PvuII Promotor-Reportergen Fragment aus dem pGUS3-Derivat p1xARE_R-GUS (siehe 2.11.1) wurde in den Transformationsvektor pOCA28 kloniert, wobei der Promotor proximal zur linken Bordersequenz (LB) liegt.

2.7.1.4 Nomenklatur:

Alle Konstrukte, die sich aus dem TA Klonierungsvektor pCR 2.01 und den PCR Promotorfragmenten ableiten, wurden in Abhängigkeit von Richtung und Startpunkt der Deletion pCR 5'461, pCR 5'400 ... usw. bzw. pCR 3'100, pCR 3'150 ... usw. bezeichnet.

Diejenigen Konstrukte, die sich aus der Umklonierung der Promotorelemente aus dem pCR 2.01 Vektor in den pGUS3 Vektor ergaben, heißen analog p5'-461GUS, p5'-400GUS....usw. bzw. p3'-100GUS, p3'-150GUS...usw.

Die Promotor-Reportergen Konstrukte im Transformationsvektor pOCA28 wurden in Abhängigkeit von Richtung und Startpunkt der Deletion pOCA-5'461GUS, pOCA-5'400GUS... usw. bzw. pOCA-3'100GUS, pOCA-3'150GUS...usw. genannt. Eine schematische Darstellung der Promotor-Reportergenkonstrukte ist in Abb. 3A (Seite 46) dargestellt.

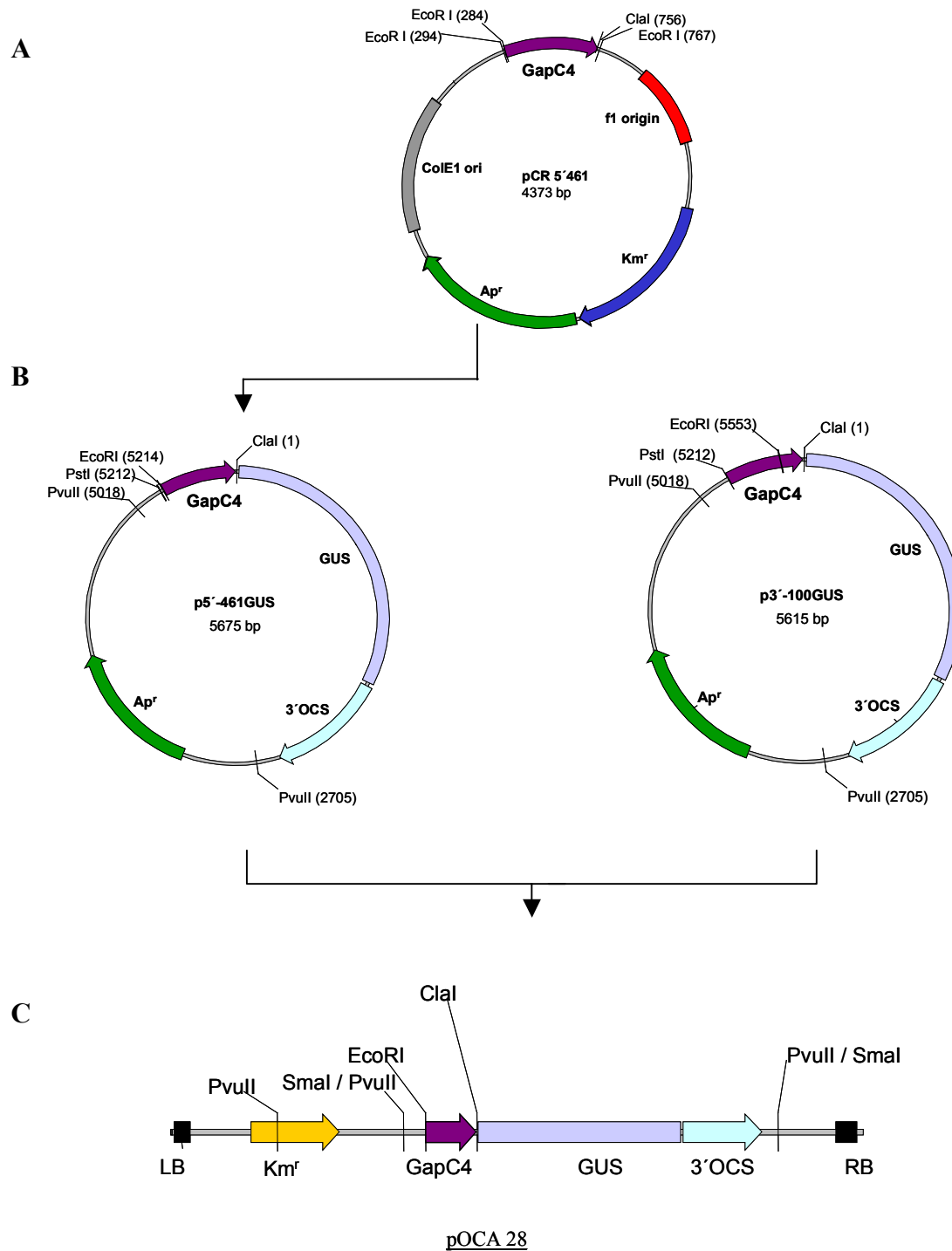


Abb. 2 *GapC4* Deletionskonstrukte. **A** pCR2.01 TA Klonierungsvektor mit 461bp *GapC4* Promotorfragment: Das PCR Fragment wurde in die TA Klonierungsstelle, die von 2 EcoRI Schnittstellen flankiert wird, kloniert. Jedes PCR-Fragment besitzt am 5' Ende eine EcoRI und am 3'Ende eine ClaI Schnittstelle (5'Deletionsfragmente) bzw. eine PstI und EcoRI Schnittstelle (3'Deletionsfragmente). **B** pGUS3 Derivate mit 5' bzw. 3' *GapC4* Deletionsfragment (p5'-461GUS, p3'-100GUS). Das Vorläufermolekül von p3'-100GUS besitzt die EcoRI/ClaI klonierte TATA-Box des *GapC4* -Gens (p5'-60GUS). Die 3'Deletionsfragmente wurden PstI/EcoRI vor die TATA-Box kloniert. **C** T-DNA Abschnitt aus dem binären Transformationsvektor pOCA28. In die SmaI Schnittstelle des Polylinkers von pOCA28 wurde das PvuII geschnittene Promotor-Reportergen aus pGUS3 kloniert. Alle pOCA28 Konstrukte enthalten das Promotor-Reportergen in der oben gezeigten Orientierung.

2.7.2 Transformation von Tabak

Transgene Tabakpflanzen wurden mit der „Leaf disk“-Transformationsmethode erzeugt (Horsch *et al.*, 1985). Bei dieser Methode wurden kleine Blattstückchen mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert, die Fremd-DNA mittels eines T-DNA Plasmids (binärer Vektor pOCA28) in die Wirtspflanze transportieren können. Die pOCA28 Derivate wurden mittels Elektroporation in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA 101 transformiert (Nagel *et al.*, 1990).

2ml ÜN Kulturen entsprechender Agrobakterienstämme (EHA101), die die Derivate des Transformationsvektors pOCA28 enthielten, wurden mit 20ml MS-Medium (1% Saccharose) verdünnt. In dieser Bakteriensuspension wurden etwa 0,5cm² große Blattstückchen gebadet. Nach 5 Min. wurden die Blattstückchen entnommen und mit sterilem 3 MM Papier wurde überschüssige Bakteriensuspension abgezogen. Die Blattstückchen wurden auf MS-Agar-Platten (1% Saccharose) ausgelegt und im Dunkeln inkubiert. Während dieser Zeit wird die T-DNA von den Agrobakterien auf die Pflanzenzellen übertragen. Nach 2-4 Tagen wurden die Blattstückchen auf kallusinduzierendes Medium umgelegt (MS-Platten mit 3% Saccharose, 0,5mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,1mg/l Naphthylsäure, 500mg/l Cefotaxim, 200mg/l Kanamycin). Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 26°C in der Lichtkammer inkubiert (12h Tag/Nacht-Rhythmus). Nach ca. 14 Tagen waren die ersten Kalli sichtbar. Die Kalli wurden vereinzelt und auf sproßinduzierendes Medium gelegt (MS-Platten mit 3% Saccharose, 2,0mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,1mg/l Naphthylsäure, 500mg/l Cefotaxim, 200mg/l Kanamycin). Nachdem sich genügend Triebe entwickelt hatten, wurden sie auf wurzelinduzierendes Medium gelegt (MS-Medium mit 3% Saccharose, 500mg/l Cefotaxim, 200mg/l Kanamycin). Nach der Bewurzelung wurden die Pflanzen in Erde umgesetzt. Dort wurden sie für 2 Tage mit einer Folie abgedeckt, die ein Austrocknen der Pflänzchen verhindern sollte.

Unter Gewächshausbedingungen im Langtag wurden die Keimlinge zu adulten Pflanzen herangezogen (R₀ Generation), geselbstet und die Samen (R₁ Generation) geerntet.

2.7.3 Streßbedingungen

Für die Untersuchungen der Promotorelemente unter anaeroben Bedingungen wurden Keimlinge der transgenen Tabakpflanzen (R₁-Generation) auf MS-Platten (3% Saccharose, 200 mg/l Kanamycin) steril in der Lichtkammer (12h Licht-Dunkelphase) angezogen. Im 4-Blatt Stadium wurden die Keimlinge für die Analysen eingesetzt. Die Keimlinge der

entsprechenden Linien wurden auf 2 Petrischalen verteilt, wovon die eine 48h aerob, die andere 48h anaerob (Anaerobentopf mit Anaerocult A von der Firma Merck) in der Lichtkammer inkubiert wurde.

2.7.4 Qualitativer GUS Test

Die histochemische Färbung erfolgte nach (Jefferson *et al.*, 1987). Die Keimlinge wurden in 2 ml Färbelösung (2,5mM X-Gluc in 50mM NaH₂PO₄) gegeben und zweimal 5 Min. vakuumfiltriert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Pflänzchen mit 70% Ethanol behandelt, um das Chlorophyll aus den Zellen zu extrahieren und somit die Blaufärbung deutlicher sichtbar zu machen.

2.7.5 Quantitativer GUS Test

100mg Blattmaterial wurden in 100µl GUS-Extraktionspuffer (50mM Na₂HPO₄, 10mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,1% Na-Laurosylysarkosylsalz und 10mM β-Mercaptoethanol) und einigen Glasperlen auf Eis mit dem Mörser homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden bei 4°C und 17000 Upm in der Eppendorffzentrifuge 10 Min. sedimentiert und der Überstand für die nachfolgende Proteinbestimmung (10 µl des Rohextrakts) nach (Bradford, 1976) und für die GUS-Aktivitätsmessung verwendet.

2.7.5.1 GUS Aktivitätsmessung am Fluoreszenz-Photometer

(Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987)

10µl Überstand (ca. 10-20µg Protein) wurden zu 50µl MUG-Puffer (GUS-Extraktionspuffer mit 1mM MUG) gegeben. Nach 2 Min. wurden 10µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und mit 1 ml Stop-Puffer (0,2 M NaCO₃) abgestoppt (t₀). Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt nach jeweils 30 Min. (t₁-t₃). Die Konzentrationen des umgesetzten Produkts (4-Methylumbelliferon: 4-MU) wurde durch Fluoreszenzanregung im Spektralphotometer (Kontron Instruments SFM 25; Exikation: 365 nm; Emission: 455 nm) bestimmt. Als relative Werte erhielt man FU (Fluoreszenzeinheiten) pro Zeiteinheit. Diese Werte wurden auf die Einheit FU*h⁻¹*µg Protein⁻¹ standardisiert.

2.7.5.2 Berechnung der absoluten GUS-Aktivität

Die relativen Werte wurden in absoluten Substratumsatz pro Zeiteinheit umgerechnet. 300 FU entsprechen einer 4-MU-Konzentration von 10 nM (Bülow, persönl. Mitteilung). Somit waren in 1ml Stoppuffer 10pmol 4-MU enthalten oder 1/30 pmol 4-MU bei 1 FU. Nach Umrechnung der FU in pmol Substratumsatz wurde die mit anderen veröffentlichten Werten vergleichbare Einheit $\text{pmol 4-MU} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Protein angegeben.

2.8 DNA-Protein Bindungsstudien

2.8.1 Streßbedingungen

Blätter junger Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* SRI), die im Gewächshaus angezogen wurden, wurden geerntet und im Anaerobentopf unter Zugabe von Anaerocult A der Firma Merck 24h anaerob inkubiert bzw. sofort für die Kernisolierung verwendet (aerob).

2.8.2 Kernisolierung aus Tabakblättern

Die Kernisolierung wurde nach einer Methode von Watson und Thompson (1986) durchgeführt.

500g junger Tabakblätter wurden in flüssigem Stickstoff fein gemörsert bzw. im „Warring Blendor“ mit 2 Liter Homogenisierungspuffer (1M 2-methyl-2,4-pentadiol (Hexylenglycol), 10mM PIPES KOH pH 7,0, 10mM MgCl_2 , 0,5% Triton X-100 (v/v), 5mM β -Mercaptoethanol, 0,8mM PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid) homogenisiert. Die Suspension wurde durch 2 und 4 Lagen Haushaltstuch filtriert und anschließend bei 3000xg für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet mit den Zellkernen in 40 ml Kern-Wasch-Puffer (0,5M Hexylenglycol, 10mM PIPES KOH pH 7,0, 10mM MgCl_2 , 0,5% Triton X-100 (v/v), 5mM β -Mercaptoethanol, 0,8 mM PMSF) resuspendiert. Danach wurde bei 3000xg und 4°C für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgezogen und der Vorgang noch einmal mit 20 ml und 3 ml Kern-Wasch-Puffer wiederholt. Die Zellkernsuspension kann zu diesem Zeitpunkt nach Zugabe von 1/3 Volumen 100% Glycerin bei –80°C gelagert werden.

2.8.3 Kernproteinisolierung

Die Isolierung von Kernproteinen erfolgte nach der Methode von Parker und Topol (1984).

Die gefrorene Kernsuspension wurde auf Eis aufgetaut und 1 Volumen Kern-Wasch-Puffer hinzugefügt. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellkernsuspension wurde 10 Min. bei 3000xg zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Pellet in 8ml Lysispuffer (110mM KCL, 15mM HEPES KOH pH 7,5, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 5µg/ml Antipain [Sigma], 5µg/ml Leupeptin [Sigma]) aufgenommen. Die Kernsuspension wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen (13 x 51 mm) überführt. Zur Fällung der DNA wurden 4 mal 200µl 4M Ammoniumsulphat in Aliquots hinzugegeben und geschüttelt. Danach wurde die DNA 30 Min. auf einem Schüttler präzipitiert. Durch 60 Min. Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 4°C und 40.000 Upm wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 13ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Kernproteine durch Zugabe von 0,3mg/ml fein zermörsertem Ammoniumsulphat aus der Lösung präzipitiert. Dabei wurde das Zentrifugenröhrchen vorsichtig auf dem Schüttler 30 Min. geschwenkt. Ausgefallenes Protein wurde bei 10.000xg für 15 Min. pelletiert und in 500µl/500g Frischgewicht in Kern-extraktionspuffer (40mM KCl, 25mM HEPES KOH pH 7,5, 0,1mM EDTA, 10% Glycerol, 1mM DTT, 5µg/ml Antipain, 5µg/ml Leupeptin) resuspendiert. Leupeptin und Antipain waren in diesem Schritt optional. Es folgte eine Dialyse gegen 500ml Kernextraktionspuffer für 2-4 h (Puffer 3x gewechselt). Unlösliches Material wurde durch Zentrifugieren in der Eppendorfzentrifuge für 10 Min. pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Aliquots der Kernproteine können mittelfristig bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden oder langfristig bei –80°C eingefroren werden.

2.8.4 DNA-Elemente und Kompetitoren für die Protein Bindungsstudien

Anaerob Response Element (ARE): Für den Nachweis von DNA-Proteinbindungen durch das Gel-Shift System wurde als radioaktiv markiertes Element ein 50bp EcoRI-Fragment aus dem Konstrukt pCR-ARE (siehe Abschnitt 2.9.2.1) eingesetzt, welches die Sequenz von Position – 299 bis –249 des *GapC4* Promotors enthält.

Kompetitoren ARE:

ARE (Cmp.1): nicht markiertes, PCR amplifiziertes ARE Fragment aus pCR-ARE (spezifischer Kompetitor)

Poly dI-dC: Polymer aus alternierenden Inositol- und Cytosinresten (unspezifischer Kompetitor)

Die folgenden Kompetitoren sind für die sequenzabhängige DNA-Protein-Bindung konstruiert wurden und enthalten Mutationen in unterschiedlichen Bereichen der ARE Sequenz. Entsprechende Bereiche sind unterstrichen. Alle Oligonukleotide wurden von Frau Elke Faurie am Gene Assembler (Pharmacia) am Institut für Genetik synthetisiert. Oligonukleotide wurden mit ihrem entsprechenden komplementären Strang äquimolar gemischt, auf 90°C erwärmt und langsam bei Raumtemperatur hybridisieren.

Cmp.2 5' ctt ccg gtg ggc ccg aaacc 3'
 3' gaa ggc cac ccg ggc tttgg 5'

Cmp.2-1: 5' tgg ccg gtg ggc ccg aaacc 3'
 3' acc ggc cac ccg ggc tttgg 5'

Cmp.2-2 5' ctt aat gtg ggc ccg aaacc 3'
 3' gaa tta cac ccg ggc tttgg 5'

Cmp.2-3 5' ctt ccg tgt ggc ccg aaacc 3'
 3' gaa ggc aca ccg ggc tttgg 5'

Cmp.2-4	5' ctt ccg gtg <u>tta</u> ccg aaacc 3'
	3' gaa ggc cac <u>aat</u> ggc tttgg 5'
Cmp.2-5	5' ctt ccg gtg ggc <u>aat</u> aaacc 3'
	3' gaa ggc cac ccg <u>tta</u> tttgg 5'
Cmp.2-6	5' ctt ccg gtg ggc ccg <u>cccaa</u> 3'
	3' gaa ggc cac ccg ggc <u>gggtt</u> 5'
Cmp.3	5' gaaaccagca acggtccagg 3'
	3' ctttggtcgt tgccaggtcc 5'
Cmp.4	5' cagggtttcc aaggtccaac 3'
	3' gtcccaaagg ttccaggttg 5'

2.8.5 Radioaktive DNA-Markierung

Das radioaktive Auffüllen 5' überstehender DNA Enden des EcoRI-Inserts von pCR-ARE mit dem Klenow Fragment von GibcoBRL erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Reaktion wurden 50 bis 100ng DNA Fragment und als radioaktiv markiertes Nukleotid 2µl [α - 32 P] dATP der Reaktion beigegeben. Die markierte DNA wurde über eine Sephadex G50 Säule gereinigt (Sambrook *et al.*, 1989) und anschließend die spezifische Radioaktivität im Scintillationszähler gemessen. Für die Gel-Shift Experimente sollten DNA Fragmente mit 10.000 bis 20.000 cpm/ng DNA eingesetzt werden.

2.8.6 Bindungsbedingungen und natives PAA-Gel

Für die Bindungsreaktion der DNA an DNA bindende Proteine wurde ein Reaktionsansatz bestehend aus 1,5µl 10x Bindungspuffer (120mM HEPES pH7,9, 10mM EDTA, 6mM DTT, 600mM KCl, 50mM MgCl₂), 1µg Poly ds(dI-dC) [Sigma], 1ng markiertes DNA Fragment (10.000 – 20.000 cpm), 3µl 50% Glycerin, 1,5µl BSA (2mg/ml), 50-1000x molarer Überschuß an Kompetitor, 15µg Kernprotein (immer zum Schluß hinzugeben) und dest. H₂O ad 15µl angesetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 15 Min. ohne markiertes DNA Fragment und anschließend nach Zugabe des DNA Fragments weitere 15 Min. inkubiert. Vor dem Beladen des Polyacrylamidgels (PAA) wurden 1,5µl 10x Ladepuffer (25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol, 2,5 g Ficoll 400 in 10 ml dest. H₂O) zur Reaktion hinzugegeben. Für die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe wurde ein 5%iges natives PAA Gel gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-Glycin-

Puffer (25mM Tris-HCl, pH8,3, 190mM Glycin, 10mM EDTA) eingesetzt. Besonders gut eignete sich die Gelelektrophoreseapparatur „Blue Vertical 100/C“ der Firma Serva. Vor dem Beladen des Gels wurde ein Vorlauf bei 25 mA (100 V) gestartet. Nach dem Beladen der Taschen mit der Reaktion wurde bei 25 mA (100V) 1 bis 2 h elektrophoretisiert. Die Bromphenolblaubande sollte abschließend das untere Ende des Gels erreicht haben. Das Gel wurde auf 3MM Papier gelegt und 30 Min. im Gelrockner getrocknet.

2.8.7 Autoradiographie

Die getrockneten Gele wurden in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Filmkassette mit Röntgenfilm eingelegt. Die Expositionsdauer betrug zwischen 24h und 72h.

2.9 ONE HYBRID SYSTEM

2.9.1 Oligonukleotide

Für die Isolierung des AREs aus dem *GapC4* Promotor durch PCR wurden folgende Primer eingesetzt:

RG 02: 5' Primer mit XbaI-Linker (pSKI)	TCTAGACTTC CGGTGGGCCC
RG 03: 3' Primer mit BamHI-Linker (pSKI)	GGATCCGTTG GACCTTGGAA
RG 04: 5' Primer mit SmaI-Linker (pYC7)	CCCGGGCTTC CGGTGGGCCC
RG 05: 3' Primer mit BglII-Linker (pYC7)	AGATCTGTTG GACCTTGGAA

Die Linker sind mit den für die spätere Klonierung in pSK1 und pYC7 essentiellen Restriktionsschnittstellen ausgestattet.

2.9.2 DNA Konstrukte

Für das ONE HYBRID SYSTEM wurden 3 Plasmide eingesetzt: pSKI ist ein Reporterplasmid mit HIS3-Gen reguliert durch einen inaktiven HIS3-Minimalpromotor, pYC7 ist ein Reporterplasmid mit dem lacZ-Gen 3' eines inaktiven CytochromC (CyCI) Minimalpromotors und pPC86 ist ein GAL4 Fusionsvektor mit konstitutiv exprimierendem Adc1 Promotor vor der GAL4 DNA-Bindedomäne und der cDNA Integrationsstelle. Alle

Plasmide tragen eine *E.coli* und eine Hefe Replikationsstartstelle, sowie das Hefecentromer CEN6, sodass sowohl in der Hefe als auch in *E.coli* Plasmidreplikation möglich ist. Alle Plasmide wurden dankenswerter Weise von SooYoung Kim zur Verfügung gestellt (Kim *et al.*, 1997).

2.9.2.1 Klonierung des AREs vor die Reportergene in pBSKI und pYC7

pCR-ARE

Anfänglich wurde das via PCR isolierte ARE Fragment aus dem *GapC4* Promotor in den TA Klonierungsvektor pCR 2.01 kloniert und sequenziert. Die Konstrukte heißen in Anlehnung an die gewählten Primer pCR-ARE B-X (BamHI-XbaI Linker) bzw. pCR-ARE S-B (SmaI-BglII Linker).

pSKI-ARE und pYC7-ARE

Das ARE Fragment wurde XbaI/BamHI bzw. SmaI/BglII in die entsprechenden Reporterplasmide umklontiert. Diese Konstrukte werden als pSKI-ARE bzw. pYC7-ARE bezeichnet.

pCR-4xARE

Ferner wurde im pCR 2.01 Vektor ein tetrameres ARE konstruiert. Ausgangsmolekül war pCR-ARE S-B, das sowohl als Akzeptor (pCR-ARE S-B EcoRV und XhoI verdaut), als auch als Donor des ARE Fragments (SmaI/XhoI geschnitten) verwendet wurde. Das SmaI/XhoI ARE Fragment wurde direkt EcoRV/XhoI in den pCR-ARE S-B Vektor 3' des 1.ARE Fragments kloniert. Dieses neue Konstrukt wurde pCR-2xARE benannt. Aus pCR-2xARE wurde das 2xARE Fragment SmaI/XhoI herausgeschnitten und in den EcoRV/XhoI geschnittenen pCR-2xARE 3' von 2xARE kloniert. Dieses Konstrukt wurde als pCR-4xARE bezeichnet und enthält ein tetrameres ARE Element.

pSKI-4xARE und pYC7-4xARE

Das tetramere ARE wurde SacI/XbaI bzw. SmaI/XhoI in pSKI bzw. pYC7 umklontiert. Die resultierenden Konstrukte heißen pSKI-4xARE und pYC7-4xARE.

pYC7-4xARE-Mu

4xARE-Mu wurde BamHI/KpnI aus dem Vektor pBSK-4xARE-Mu (2.11.1) herausgeschnitten und BglII/KpnI in den Vektor pYC7 kloniert.

pYC7-GapC4

Der 461bp *GapC4* Promotor wurde mit KpnI/XhoI aus dem Vektor pCR-5'-461 (2.7.1.3.1) herausgeschnitten und in den KpnI/XhoI geschnittenen Vektor pYC7 kloniert.

2.9.3 Herstellung einer anaerob induzierten cDNA Bank

Junge Tabakpflanzen wurden geerntet und 12 h unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde RNA und daraus PolyA⁺mRNA isoliert (2.5.2). 3µg mRNA wurden eingesetzt und nach den Protokollen des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das Kit der Firma GibcoBRL „SUPERScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning“ verwendet. Die erfolgreich umgeschriebene cDNA enthielt am 5'Ende eine SalI und am 3'Ende eine NotI Schnittstelle.

2.9.4 Klonierung der cDNA Bank in pPC86

Für die Klonierung der cDNA in den GAL4 Fusionsvektor pPC86 wurde ebenfalls nach den Herstellerangaben verfahren (GibcoBRL „SUPERScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning“). Insgesamt wurden 1,5µg pPC86 mit 100ng cDNA ligiert. Daraus resultierte eine cDNA Bank mit $1,5 \times 10^6$ Klonen. Die Bank wurde auf 15 LB-Platten zu 100.000 cfu ausgestrichen und amplifiziert. Anschließend wurden die Kolonien von der Platte in LB-Medium resuspendiert und aus dieser Bakteriensuspension DNA isoliert. 50µg DNA wurden eingesetzt, um damit den Reporterstamm YM954-ARE-lacZ-his3 bzw. YM954-4xARE-lacZ-his3 (2.9.7) zu transformieren. $1,25 \times 10^6$ rekombinante Hefeklonen wurden erzeugt.

2.9.5 Synthetisches Minimalmedium für Hefen (SD: Synthetic Dropout)

Synthetische Minimalmedien dienen der Selektion von Hefetransformanten bezüglich ihres Phänotyps. Es ist aus 2 Komponenten aufgebaut. Eine Komponente sind die Basisnährstoffe (Stickstoff- und Kohlenstoffderivate: Difco Yeast Nitrogen Base). Die andere Komponente

ist die Mischung essentieller Aminosäuren und Nukleoside (DO: dropout). In Abhängigkeit der Selektion auf einen bestimmten Marker kann die DO-Lösung modifiziert werden (z.B. Selektion auf Tryptophan Auxotrophie durch DO-Lösung ohne Tryptophan).

10x DO

L-Isoleucin	300mg/ml
L-Valin	1500mg/ml
L-Adeninhemisulphat	200mg/ml
L-Arginin	200mg/ml
L-Histidin	200mg/ml
L-Leucin	1000mg/ml
L-Lysin	300mg/ml
L-Methionin	200mg/ml
L-Phenylalanin	500mg/ml
L-Threonin	2000mg/ml
L-Tryptophan	200mg/ml
L-Thyrosin	300mg/ml
L-Uracil	200mg/ml

2.9.6 Hefetransformation

Die Transformation der Hefen wurde nach dem Protokoll von Gietz *et al.* (1995) durchgeführt. Dazu wurden die Hefen über Nacht in 5ml der entsprechenden Nährlösungen (YPAD: 6g Hefeextrakt, 12g Pepton, 12g Glukose, 60mg Adeninhemisulphat, 600ml dest. H₂O oder SC: 4g Difco Yeast Nitrogen Base, 12g Glukose, 60ml 10x DO, 540ml dest. H₂O) bei 30°C inkubiert und am nächsten Morgen in 50 ml vorgewärmtes (30°C) YPAD-Medium überführt. Die Zelldichte sollte 5×10^6 Zellen/ml betragen. Nach 3 stündiger Inkubation auf dem Schüttler bei 30°C sollten sich die Zellen mindestens 2 mal geteilt haben und die Zelldichte 2×10^7 Zellen/ml betragen. Die Kultur reicht aus um 10 Transformationen durchzuführen. Dazu wurde die Kultur in ein steriles 50 ml Falcongefäß überführt und bei 3000xg 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen. Erneut wurde bei 3000xg 10 Min. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde nun in 1ml 100mM LiAc resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt, 15 Sek. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in einem Gesamtvolumen von 500µl mit 100mM LiAc aufgenommen und auf 10

Eppendorfgefäße aliquotiert; erneut wurde 15 Sek. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf das Pellet in folgender Reihenfolge gegeben: 240 µl 50% PEG, 36 µl 1M LiAc, 25 µl Heringsperma-DNA (2mg/ml), 50 µl Plasmid-DNA (0,1 bis 10µg). Nach kräftigem Vortexen (1 Min.) wurde 30 Min. bei 30°C inkubiert, danach folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 20-25 Min. Die Zellen wurden bei 6000 bis 8000 Upm 15Sek. pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1ml sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 200µl sterilem Wasser aufgenommen. Auf geeigneten Selektionplatten können bis zu 200µl ausplattiert werden. Nach 2-4 Tagen bei 30°C sind die Transformanten sichtbar.

2.9.7 Reporterhefe

Für das ONE HYBRID SYSTEM wurde ein Reporterstamm erzeugt, der die beiden Reporterplasmide, pSK-ARE und pYC-ARE, enthielt. Dazu wurde der Hefestamm YM954 transformiert. Der entsprechende Reporterstamm trägt die Bezeichnung YM954-ARE-lacZ-his3. Ein weiterer Reporterstamm enthält die Plasmide pSK-4xARE und pYC-4xARE. Dieser Stamm heißt YM954-4xARE-lacZ-his3.

2.9.8 Untersuchung der Reporterhefe

2.9.8.1 Selektion auf His⁻ Selektionsmedium

Der Reporterstamm wurde mit 5µg cDNA Plasmid pPC86 transformiert (2.9.6). Das cDNA Plasmid pPC86 trägt den Selektionsmarker TRP1. Die Transformationseffizienz wurde auf Trp⁻-Selektionsmedium bestimmt (6,7g Yeast Nitrogen Base, 20g Agar, 850ml H₂O und 100ml 10x DO [ohne Tryptophan], pH Wert 5,8, 100ml 20%ige Glukoselösung). 2µl des Transformationsansatzes wurden in 50 µl sterilem H₂O verdünnt und auf Trp⁻-Selektionsplatten ausgestrichen. Die Transformationseffizienz lag bei 4×10^5 Kolonien/5µg cDNA Plasmid. Insgesamt wurden 2×10^6 Kolonien für das ONE HYBRID SYSTEM eingesetzt. 198µl wurden in flüssigem Selektionsmedium 1:500 verdünnt. Die Selektionsmarker (LEU2 für pSK1, TRP1 für pPC86 und URA3 für pYC7) dienen der Erhaltung der Plasmide in der transformierten Hefe (6,7g Yeast Nitrogen Base, 850ml H₂O und 100ml 10x DO Lösung [ohne Tryptophan, Leucin, Uracil]; pH Wert 5,8, 100ml 20%ige Glukoselösung). Es folgt eine Inkubation bei 30°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden

die Zellen pelletiert, in 1ml sterilem H₂O resuspendiert und mit je 100µl auf His⁻ Leu⁻ Ura⁻ Trp⁻ Selektionsplatten ausgestrichen (wie Flüssigmedium (s.o.), mit veränderter 10x DO [ohne Tryptophan, Leucin, Uracil und Histidin, zusätzlich 15ml 1M 3-aminotriazol Lösung und 20g Agar je Liter). Nach 4-6 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien auf frischen Selektionsmedien erneut ausgestrichen und auf β-Galaktosidase Aktivität untersucht.

3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) ist ein kompetitiver Inhibitor gegen das HIS3 Genprodukt. In einigen Hefestämmen wurde leichte HIS3 Aktivität festgestellt. Empirisch ermittelte 3-AT Konzentrationen unterdrücken diesen Phänotyp. Für die hier verwendeten Hefestämme YM954-ARE-lacZ-his3 und YM954-4xARE-lacZ-his3 war eine Konzentration von 15mM 3-AT ausreichend, um die HIS3-Aktivität zu unterdrücken, ohne jedoch die überexprimierte HIS3-Aktivität zu kompensieren.

2.9.8.2 β-Galaktosidase Untersuchung

(Clontech (2000). Yeast Protocols Handbook: D. Liquid Culture Assay Using ONPG as Substrate. PT3024-1 (PR03065), 27-29.)

2.9.8.2.1 *in vivo* Test

HIS3 positive Kolonien wurden auf Trp⁻, Leu⁻, Ura⁻ und His⁻ Selektionsplatten (s.o.) ausgestrichen, die zusätzlich das Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) in einer Konzentration von 80µg/ml und eine einfache Konzentration von Puffersalzen (10x Puffersalze: 70g Na₂HPO₄ • 7 H₂O, 30g NaH₂PO₄ auf 1 Liter H₂O; pH 7,0) beinhielten. Die Platten wurden 3-6 Tage bei 30°C inkubiert und wurden gelegentlich (maximal 96h Inkubationszeit) auf Blaufärbung der Kolonien untersucht. Allgemein waren die Kolonien, die auf X-Gal Platten wuchsen, kleiner als solche auf Platten ohne X-Gal.

2.9.8.2.2 Filterpapierabzug (Colony-Filter-Lift-Assay)

HIS3 positive Kolonien wurden auf Trp⁻, Leu⁻, Ura⁻ und His⁻ Selektionsplatten (s.o.) angezogen, bis sie ca. 1-2mm groß waren (ca. nach 2-4 Tagen bei 30°C). Steriles Filterpapier (Whatman) wurde auf die Platten gelegt und dort bis zum völligen durchweichen belassen. Die Kolonien hefteten sich an die Oberfläche des Papiers. Bevor der Filter mit den Kolonien abgezogen wurde, wurde die Orientierung auf der entsprechenden Platte durch 3 Einstiche mit einer sterilen Nadel markiert. Dies half bei der späteren Zuordnung positiver Kolonien. Zwischenzeitlich wurde ein weiteres Filterpapier in einer Petrischale mit 2ml Färbelösung inkubiert (100ml Z-Puffer [16,1g Na₂HPO₄ • 7H₂O, 5,5g NaH₂PO₄ • H₂O, 0,75g KCl, 0,246g

MgSO₄, auf 1 Liter mit H₂O auffüllen, pH 7], 0,27 ml β -Mercaptoethanol, 1,67ml X-Gal Stammlösung [20mg/ml DMF]). Der durchfeuchtete Filter wurde von der Agarplatte vorsichtig abgezogen, sodass die Hefekolonien daran heften blieben. Mit der Kolonieseite nach oben wurde der Filter 10 Sek. in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend taute er bei Raumtemperatur auf, bevor er auf den in Färbelösung getränkten 2. Filter gelegt wurde. Die Kolonieseite zeigte dabei nach oben. Die Petrischale wurde mit Parafilm verschlossen, um der Verdunstung des β -Mercaptoethanols vorzubeugen. Nach 1 bis 8h Inkubation der Filter bei 30°C entwickelte sich bei lacZ⁺ Zellen eine Blaufärbung (längere Inkubationszeiten führten zur Auswahl falsch positiver Kolonien). Der Vergleich der Filter mit der zugehörigen Platte identifizierte die positiven Kolonien.

2.9.8.2.3 Flüssigkulturuntersuchung auf β -Galaktosidaseaktivität mit ONPG als Substrat

5 ml einer Hefe-Übernachtskultur wurden im passenden Selektionsmedium (YPAD, SD) angezogen. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur 0,5 – 1Min kräftig gemischt und 2ml in 8ml YPAD-Medium (s.o.) überführt. Nach 3-5 h Inkubation bei 30°C wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Sie sollte 0,5-0,8 betragen (mittlere log-Phase). Von dieser Kultur wurden 1,5ml jeweils in 3 Eppendorfgefäße (1,5ml) überführt. Die Zellen wurden bei 10.000xg für 30 Sek. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml Z-Puffer (s.o.) resuspendiert. Erneut wurden die Zellen bei 10.000xg für 30 Sek. pelletiert und in 300 μ l Z-Puffer aufgenommen. Die Zellen waren jetzt 5x konzentriert. 100 μ l der Zellsuspension wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1Min. in flüssigen Stickstoff gehalten. Danach wurden die gefrorenen Gefäße eine Minute bei 37°C inkubiert. Die letzten beiden Arbeitsschritte wurden 2 mal wiederholt, um sicher zustellen, dass alle Zellen aufgeschlossen waren. Zwischenzeitlich wurden Blindkontrollen mit 100 μ l Z-Puffer vorbereitet.

Es folgte die Zugabe von 700 μ l Z_{Mercaptoethanol}-Puffer (100ml Z-Puffer plus 270 μ l β -Mercaptoethanol) auf alle Proben und die Blindkontrollen. Anschließend wurde die Zeitmessung gestartet und alle Proben sofort mit 160 μ l Z_{ONPG}-Puffer (4mg ONPG/ml Z-Puffer) inkubiert. Sobald sich eine gelb gefärbte Lösung ergab, wurde die Reaktion mit 400 μ l einer 1 M Na₂CO₃ Lösung abgestoppt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 Min. bei 15000 Upm in der Eppendorffzentrifuge abgetrennt und der Überstand in eine Küvette überführt. Bei 420 nm wurde die optische Dichte (OD₄₂₀) am Photometer festgestellt. Für die Berechnung der β -Galaktosidase Aktivität wurde folgende Formel verwandt:

$$\beta\text{-Galaktosidase Einheiten} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

t = Zeit bis zum Abstoppen der Reaktion

V = Verdünnungsfaktor

2.9.9 Miniplasmidpräparation aus Hefe für die Elektroporation von E.coli

Die Plasmidpräparation wurde nach einer Methode von Piper (1996) durchgeführt. Dazu wurden aus einer 2ml ÜN-Hefekultur 1,5ml in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 100µl LiCl-Triton X-100 Puffer (2,5M LiCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 4% (v/v) Triton X-100, 62,5mM EDTA) resuspendiert. Zusätzlich wurden 100µl Phenol-Chloroform (1:1) und 0,2g Glaskügelchen mit dem Durchmesser 0,45µm hinzugegeben. Die Suspension wurde 2 Min. lang kräftig gemischt und danach bei 15.000xg 1 Min. zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Aus dem Überstand wurde mit 2 Volumen Ethanol DNA präzipitiert. Nach 5 Min. auf Eis wurde für 10 Min. bei 15.000xg zentrifugiert und die DNA pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und in 20µl LTE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1mM EDTA) resuspendiert. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.9.10 Plasmid-DNA Transformation von E.coli durch Elektroporation

(Miller, 1994)

2.9.10.1 Herstellen elektrokompetenter Zellen

Der E.coli Stamm KC8 wurde in einer 5 ml ÜN-Kultur in LB-Medium (3,2% Trypton, 2% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) angeimpft und bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen 1:100 in LB-Medium verdünnt und 3h bei 37°C inkubiert ($\text{OD}_{600} = 0,5$). Danach wurde die Zellsuspension 15-30 Min. auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 4000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in dem ½ Volumen mit sterilen, destillierten Wasser resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet erneut in 1/50 Volumen mit destillierten Wasser resuspendiert. Ein weiteres Mal wurde zentrifugiert und das Pellet in 1/500 Volumen mit destillierten Wasser aufgenommen. Werden die Zellen nicht sofort benötigt können sie nach Zugabe von 10% Glycerol 1 Jahr lang bei –80°C gelagert werden.

2.9.10.2 Elektrotransformation

Zunächst wurde eine entsprechende Anzahl Elektroporationsküvetten (0,2 cm Spalt) auf Eis vorgekühlt. Je 40 µl kompetente Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 1-4 µl Plasmid-DNA, die in LTE gelöst vorlag, hinzugegeben und gemischt. Der Inhalt der Eppendorfgefäße wurde auf den Boden der Elektroporationsküvette transferiert und 1-2 Min. auf Eis inkubiert. Für die Elektroporation wurde der Bio-Rad Gene Pulser eingesetzt (2,5 kV, 25 µF, 200Ω). Die Zeitkonstante für einen Impuls beträgt ca. 4,8-5 mSek. Nach dem Impuls wurde 1ml vorgewärmtes (37°C) SOC-Medium (2% Bactotrypton, 0,5% Yeastextract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, pH 6,8- 7,0) in die Küvette gegeben und anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine 1h Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler. 200µl wurden auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert. KC8 Zellen sind Tryptophan auxotroph. Daher ist die gezielte Selektion auf das Plasmid mit dem TRP1-Marker (pPC86) möglich. Als Selektionsmedium wurde ein M9-Medium nach Sambrook *et al.* (1989) eingesetzt: 900ml M9-Medium, 1ml Ampicillin [50mg/ml], 1ml 1M Thiamin-HCl, 100ml sterilfiltrierte 10x DO-Lösung [2.9.5, ohne Tryptophan].

2.9.11 cDNA Sequenzierung

Das cDNA Insert aus dem Plasmid pPC86 wurde mit flankierenden Primern nach der unter 2.6.1 beschriebenen PCR-Methode amplifiziert (PC86A25: TCACTACAGGGATGTTTA ATACCAC; PC86B25: TTGATTGGAGACTTGA CCAAACCTC). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.01 (Invitrogen) via TA-Klonierungsmethode (Invitrogen) kloniert und von beiden Seiten wie unter 2.3 beschrieben im A.L.F. sequenziert.

2.9.12 Datenbankanalyse

Homologievergleiche wurden in der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genbank mit dem BLAST Programm vorgenommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997).

Identifizierung potentieller Bindungssequenzen unter anderem im *GapC4* Promotor wurde mit den Programmen MatInspector (Quandt *et al.* 1995) und PatSearch (Wingender *et al.*, 1997) in der TRANSFAC Datenbank durchgeführt (<http://transfac.gbf.de/>, TRANSFAC: Wingender *et al.*, 2000)

2.10 South-Western Screen

(Somssich, 1996), verändert nach Rushton und Weißhaar, persönl. Mitteilung

2.10.1 Herstellung der Sonde

Für die Herstellung der Sonde wurde aus dem Plasmid pCR-4xARE mit HindIII und XhoI das 4xARE herausgeschnitten und anschließend die überstehenden Enden mit dNTP's aufgefüllt. Dabei wurde durch Inkorporation von radioaktiv markierten [α - 32 P] dCTP nach der Methode, wie unter 2.8.5 beschrieben, das 4xARE Fragment markiert.

2.10.2 Herstellung der anaeroben cDNA Bank in λ -ZAP ExpressTM

12h anaerob induzierte junge Tabakpflanzen wurden für die Herstellung der cDNA Bank eingesetzt. Die Extraktion von RNA und PolyA⁺ mRNA wurde bereits unter 2.5.1 beschrieben. Das Umschreiben der PolyA⁺ mRNA in cDNA und Klonierung der cDNA in den λ -ZAP ExpressTM Vektor erfolgte nach Protokollen der Herstellerfirma Stratagene.

2.10.3 Screening-Verfahren

Es wurden 50ml 2xYT (1,6% Trypton, 1% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) mit 0,5ml 20% Maltoselösung und 0,5ml 1M MgSO₄-Lösung versetzt und mit XL1-Blue-MRF' Zellen über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen abzentrifugiert und in 20ml 10mM MgSO₄ Lösung resuspendiert, sodass die Zellkonzentration einer optische Dichte (OD₆₀₀) zwischen 1,9 und 2,4 entsprach. Zur gleichen Zeit wurden die Petrischalen (Ø 150mm) mit den Nährmedien (1,5% Agar in 2xYT) auf 42°C vorgewärmt, Top-Agar (0,7% Agar in 2xYT) aufgeschmolzen und in einem 48°C warmen Wasserbad abgekühlt.

25000 pfu wurden mit 600 µl XL1-Blue MRF' Zellen bei 37°C für 20 Min. inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension zu 7ml Top-Agar gegeben, gemischt und sofort auf die vorgewärmten 2xYT Platten verteilt. Anschließend wurden die Platten für 3,5-4h bei 42°C inkubiert.

Inzwischen wurden Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schüll, Ø 132 mm) in 10 mM IPTG getränkt und anschließend mindestens 4h unter dem Abzug getrocknet. Pro Platte wurden 2 Filter benötigt (Original- und Duplikatfilter).

Nach 4h sollten die ersten winzigen Plaques im Bakterienrasen zu erkennen sein. Zu diesem Zeitpunkt wurde der erste Nitrozellulosefilter auf die Platten gelegt. Es folgte eine weitere

Inkubation bei 37°C für 6,5-7h. (Die Länge der Inkubation war kritisch, weil Inkubationszeiten unter 6h kein Signal auslösen).

Nach 7h wurden die ersten Filter von den Platten abgezogen. Zuvor wurde der Filter gekennzeichnet und durch 3 ungleiche Einstiche durch Filter und Agar mit einer sterilen Nadel seine genaue Position markiert. Die Filter können bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Anschließend wurde der 2. IPTG getränkte Filter aufgelegt (Duplikatfilter). Auch dieser Filter wurde mind. 7h mit den Platten inkubiert. In der Regel war dies über Nacht. Anschließend wurde analog zum ersten Filter verfahren.

Am darauf folgenden Morgen wurden alle Filter mit 6M Guanidin-HCl in 1x Bindungspuffer (12mM HEPES pH 7,9, 1mM EDTA, 0,6mM DTT, 60mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT) gewaschen (Denaturieren der Proteine). Je Filter (Ø 132mm) wurden 30 ml benötigt. Die Filter wurden in Petrischalen vorsichtig 5 Min auf dem Schüttler inkubiert. 15 ml wurden je Petrischale abgezogen und durch 1x Bindungspuffer ersetzt und erneut 5 Min. auf dem Schüttler geschwenkt. Der letzte Schritt wurde 4 Mal wiederholt (Renaturieren der Proteine). Danach wurde der gesamte Puffer aus den Petrischalen dekantiert und durch 30 ml neuen Bindungspuffer ersetzt. Auf dem Schüttler wurde 5 Min. inkubiert und anschließend der Bindungspuffer durch 30ml Prehybridisierungspuffer (1x Bindungspuffer mit 2,5% Milchpulver und 1µg/ml tRNA) je Filter ersetzt. Die Filter wurden bei vorsichtigem Schütteln 1h inkubiert. Danach wurde der Prehybridisierungspuffer abgenommen und die Filter zweimal mit 1x Bindungspuffer kalibriert. Der Bindungspuffer wurde abgenommen und die Filter in die Hybridisierungslösung (10µl Heringssperma DNA (10mg/ml), 10µl Hefe tRNA (10mg/ml) und 50-100µl Sondenlösung (20.000 cpm/ng) in 1x Bindungspuffer) überführt. Dabei wurden je Filter 10ml Hybridisierungslösung benötigt. *[Maßgeblich für die Reduktion der Hintergrundsignale ist ein experimentell ermitteltes Verhältnis von Kompetitor-DNA und eingesetzter Sonde. Es empfiehlt sich daher der Einsatz einer Positivkontrolle anhand der man dann die entsprechenden Modifikationen des Protokolls vornehmen kann, sodass der Hintergrund weitestgehend reduziert ist.]*

Die Filter wurden auf dem Schüttler 1h inkubiert. Nach 1h Stunde wurde die Sondenlösung abgenommen und bei -20°C für nachfolgende Experimente gelagert. Die Filter wurden mit 30ml je Filter in 1x Bindungspuffer 4 mal gewaschen. Anschließend wurden sie auf 3 MM Papier getrocknet und danach autoradiographiert.

Positive Signale sollten nach einer ÜN-Exposition sichtbar sein. Alle Plaques, die ein starkes Signal geben bzw. auf beiden Filtern ein Signal geben, wurden isoliert und in einer weiteren

Selektionsrunde vereinzelt (Sambrook *et al.*, 1989).

Nachdem alle Plaques aufgereinigt waren, wurde in einem sogenannten Pizza-Experiment, die Spezifität der einzelnen DNA-Proteinbindungen überprüft. Dabei wurden die Filter in 4 Teile geschnitten und mit unterschiedlichen Kompetitoren inkubiert. Die Kompetitoren wurden dabei so gewählt, dass sie das *cis*-Element, welches als Sonde zugrunde liegt, kopieren (spezifischer Kompetitor) oder als nicht funktionelle Versionen des *cis*-Elementes vorliegen. Je nach Hybridisierungsmuster unter dem Einfluß der verschiedenen Kompetitoren konnten die sequenzspezifischen Bindungen von den unspezifischen Bindungen unterschieden werden.

2.11 Untersuchungen im transienten System (Tabak)

2.11.1 DNA Konstrukte: Promotorrekonstruktion

p1xARE-GUS und p4xARE-GUS: Das ARE –Element wurde aus dem Plasmid pCR-ARE S-B bzw. pCR-4xARE (siehe 2.9.2) mit SmaI und EcoRV ausgeschnitten und in die aufgefüllte EcoRI Schnittstelle von p5'60GUS vor das Minimalpromotorfragment kloniert. Dabei ist die Orientierung des ARE bzw. 4xARE Fragments wie im *GapC4* Promotor beibehalten worden.

pASB-GUS: Das 190bp ASB Fragment (-386 bis -196) wurde via PCR (Primerpaarung F2-R13, siehe 2.7.1.1 und 2.7.1.12) amplifiziert und in den TA Klonierungsvektor pCR 2.01 kloniert und sequenziert (pCR-ASB). Anschließend wurde das ASB Fragment mit EcoRI ausgeschnitten und in die EcoRI Schnittstelle 5' vor das *GapC4* Minimalpromotorfragment in den p5'60GUS Vektor kloniert.

p3'100TATA-Mu: Zunächst wurde das mutierte TATA Box Fragment aus dem *GapC4* Promotor amplifiziert, wobei Primer verwendet wurden, in denen das TATA-Box Motiv (TTTATATA, -46 bis -39) durch 8 Thymidinreste ersetzt wurde. An den Primer befinden sich EcoRI und ClaI Linker, die das mutierte TATA-Box Fragment (-46 bis +14) flankieren. Das PCR Fragment wird in den TA Klonierungsvektor pCR 2.01 kloniert (pCR-TATA-MU) und sequenziert. Anschließend wird das TATA-MU Fragment mit EcoRI/ClaI ausgeschnitten und in den ebenfalls EcoRI/ClaI geschnittenen pGUS3 Vektor direktional 5' vor das GUS Reportergen kloniert (pTATA-MU-GUS). Anschließend wurde das 3'100 *GapC4* Fragment aus dem Vektor pCR-3'100 (2.7.1.3.1) PstI/EcoRI ausgeschnitten und in den PstI/EcoRI

geschnittenen pTATA-MU-GUS Vektor 5' vor den mutierten Minimalpromotor kloniert (p3'100TATA-MU)

p4xARE-MU: Zunächst wurden die komplementären Oligonukleotide von ARE-MU-1 bis ARE-MU-5 (siehe 2.8.4) zu doppelsträngiger DNA verschmolzen und anschließend in die EcoRV Schnittstelle von pBSK kloniert (pBSK-1xARE-MU). Die Orientierung aller fünf ARE-MU im pBSK ist gleich. Für die Konstruktion der pBSK-2xARE-MUs wurden die 1xARE-MU SmaI/XhoI aus pBSK-1xARE-MU ausgeschnitten und in den entsprechenden HincII/XhoI geschnitten pBSK-1xARE-MU Vektor kloniert (pBSK-2xARE-MU). Für die Konstruktion der pBSK-4xARE-MUs wurden die 2x MU SmaI/XhoI aus den pBSK-2xARE-MUs ausgeschnitten und in den entsprechenden HincII/XhoI geschnitten pBSK-2xARE-MU Vektor kloniert (pBSK-4xARE-MU). Die 4xARE-MUs wurde mit HincII und SmaI ausgeschnitten und in die aufgefüllte EcoRI Schnittstelle von p5'60GUS vor das Minimalpromotorfragment kloniert (p4xARE-MU). Dabei ist die Orientierung aller fünf 4xARE-MUs wie im *GapC4* Promotorbeibehalten und durch Sequenzierung bestätigt worden.

2.11.2 Transformation von Tabakblättern mit der Partikelkanone

Aus jungen Tabakblättern wurden mit einem Stanzgerät runde Blattstückchen aus der Blattspreite gestanzt, die einen Durchmesser von 2cm aufwiesen. Diese Blattstückchen wurden zu viert auf einen feuchten Rundfilter um das Zentrum einer Petrischale platziert und in dieser Formation durch die Partikelkanone beschossen.

Für die Transformation wurden Goldpartikel der Firma Biorad eingesetzt (\varnothing 0,4-1,2 μ m). Zusätzlich zu den Promotorkonstrukten wurde ein 2. Plasmid cotransformiert, wobei es sich um das Plasmid pRT101LUC handelte, welches das Luciferasegen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors trägt (interne Kontrolle). Die Goldpartikel wurden mit je ca. 10 μ g Plasmid-DNA beladen, wobei von allen zu testenden Plasmiden äquimolare Mengen eingesetzt wurden.

Das Beladen der Goldpartikel erfolgte nach dem CaCl₂-Spermidin Protokoll von Klein *et al.* (1988). 6mg Goldpartikel wurden in 200 μ l 70% Ethanol aufgenommen, resuspendiert und 30 Min. (bzw. über Nacht) inkubiert. Anschließend wurden die Partikel bei 500 Upm ungebremst in der Eppendorffzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet erneut mit 100 μ l H₂O resuspendiert und 10 Min inkubiert. Danach wurde mit 500 Upm ungebremst zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Pellet wurde in 100 μ l 50% Glycerin

aufgenommen, gevortext bis die Partikel in Suspension waren und 10 Sek. ultrabeschallt. Die Suspension wurde auf Eis gestellt, DNA (2x10µg in 10 bis 15µl) hinzugefügt, mit der Pipettenspitze gemischt, noch einmal manuell leicht gemischt und 15 Min. auf Eis stehen gelassen. Nach der Zugabe von 100µl 2,5M CaCl₂ wurde erneut gemischt, nach einer Min. 40µl kaltes 0,1 M Spermidin hinzugefügt, gemischt und für 10 Min auf Eis stehen (beladene Goldpartikel beginnen zu sedimentieren). Es wurde 15 Sek. bei 500 Upm ungebremst zentrifugiert und das Pellet in 200µl 70% Ethanol resuspendiert. Die Suspension wurde 15 Sek. erneut zentrifugiert und das Pellet in 100µl 100% Ethanol aufgenommen und resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, das Pellet in 70µl 100% Ethanol resuspendiert und kurz vor dem Auftragen auf den Makrocarrier („flying disk“) 2-3 Sek. im Ultraschallbad behandelt. 5-7µl wurden auf den Makrocarrier aufgetragen.

Die Transformation erfolgte nach Sanford (1988). Die Blattstückchen wurden mit der Partikelkanone (Du Pont, PDS-1000) mit 1200psi (Pounds per square inch) in einem Vakuum von 25 mm Quecksilbersäule transformiert. Von den 4 beschossenen Blattstückchen wurden je 2 unter normalen (Normoxia) und 2 unter anaeroben Bedingungen 24h inkubiert.

2.11.3 Streßbedingungen

Die Blattstückchen wurden aerob und anaerob 24 Stunden in der Lichtkammer (12h Tag, 12h Nacht, 20°C) inkubiert. Die anaeroben Bedingungen wurden mittels Anaerocult A der Firma Merck im Anaerobentopf hergestellt.

2.11.4 Luciferasetest

Das ausgestanzte Blattstückchen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, 180µl Extraktionspuffer (0,1M NaH₂PO₄, pH 7,8, 1mM DTT) hinzugefügt und homogenisiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Aufgebrochenes Zellmaterial wurde bei 17.000 Upm und 4°C in der Eppendorfszentrifuge pelletiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde der Proteingehalt des Überstandes nach Bradford bestimmt. Die Luciferaseaktivität wurde nach de Wet *et al.* (1987) bestimmt. 50 µl des Proteinüberstands wurden zu 350µl Luciferasepuffer (25mM Glycylglycin, 15mM MgSO₄, 1mM ATP, pH 7,8) gegeben und die Lichtblitze im Luminometer (Berthold Lumat 9501) nach Injektion von 150µl Substratlösung (0,2mM Luciferin in 25mM Glycylglycin pH7,8) 10 sek. lang gezählt.

2.11.5 GUS-Test

10 µl des Proteinüberstandes aus 2.11.4 wurden zu 50µl GUS-Extraktionspuffer (50mM Phosphatpuffer pH 7,0, 10mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,4% Sarcosyl, 10mM β-Mercaptoethanol, 1mM 4-Methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG)) gegeben und 0 Min (t_0), 15 Min. (t_1), 30 Min. (t_2), 45 Min. (t_3) bei 37°C inkubiert und je Zeitpunkt 10µl in 1ml 0,2M Na₂CO₃ abgestoppt (vergleiche 2.7.5).

2.11.6 Berechnung der relativen Promotoraktivität

Die Bestimmung der relativen Promotoraktivität erfolgte modifiziert nach Schledzewski und Mendel (1994). Die Auswertung für die aerob und anaerob induzierten Blattstückchen wurde getrennt vorgenommen. Von jedem Fluoreszenzwert (t_1 - t_3) wurde der Nullwert (t_0 ; unspezifische Hintergrundfluoreszenz) subtrahiert und der Mittelwert pro Stunde bestimmt. Von diesem Wert wurde der Durchschnittswert der unbeschossenen Kontrolle (kinetische Hintergrundaktivität) subtrahiert (korrigierte FU/h). Diese Fluoreszenzwerte wurden mittels des Luciferasewertes korrigiert. Dazu wurde der höchste in den Transformationen erhaltene Luciferasewert ermittelt und vorausgesetzt, dass alle anderen geringeren Luciferasewerte auf eine geringere Transformationseffizienz zurückzuführen sind. Nach Subtraktion des Wertes der unbeschossenen Kontrolle, wurden alle Luciferasewerte durch den höchsten Wert dividiert und man erhält die Relative Luciferase Einheit (RLU). Durch diesen Wert (zwischen 0 und 1) wurden die Fluoreszenzwerte der jeweiligen Transformationen der GUS-Tests dividiert. Mit den Proteinwerten wurde genauso verfahren: Der höchste Proteinwert wurde bestimmt und alle anderen durch diesen Wert dividiert. Durch diese Relative Proteineinheit (RPU) sind die jeweiligen Fluoreszenzwerte dividiert worden. Damit sind alle GUS-Werte untereinander vergleichbar, weil sie sich auf eine gleiche Transformationsrate und gleiche Proteinmenge beziehen. Wenn ein Wert stark von den anderen Werten eines Konstrukts abwich, wurde der entsprechende Wert in der Auswertung nicht berücksichtigt. Diese Werte sind durch ein Minuszeichen (-) in den Auswertungstabellen gekennzeichnet. Von den übrigen GUS-Werten pro Konstrukt wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen in transgenen Tabakpflanzen: Promotordeletionen

Die Promotorregion der Glycerin-3-phosphatdehydrogenase 4 (*GapC4*) aus Mais wurde in vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Köhler *et al.*, 1995; Manjunath und Sachs, 1997) und hinsichtlich ihrer anaerob spezifischen, ubiquitären Genregulation im heterologen Pflanzensystem untersucht (Köhler *et al.*, 1996). In transgenem Tabak ist ein Bereich von 461bp ausreichend, um das Reportergen β -Glucuronidase (GUS) nach 48h Anaerobiose mehr als 1000-fach über unspezifischen Hintergrund zu induzieren. Dieser Bereich liegt zwischen -447 und +14 relativ zum Transkriptionsstart (Manjunath und Sachs, 1997). Im folgenden soll der Frage nach *cis*-regulatorischen Elementen innerhalb dieser Promotorregion nachgegangen werden.

3.1.1 Identifizierung eines anaerob sensitiven Bereichs (ASB)

Zur Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente wurden progressive Deletionskonstrukte der Promotorregion hergestellt. Dabei wurden sowohl vom 5'- als auch vom 3'- Ende (5' zur *GapC4* TATA-Box) Deletionen vorgenommen. Wie in Abb. 3A gezeigt, orientieren sich die Deletionsendpunkte an Motiven anaerob spezifischer Promotoren, die durch Datenbankanalysen identifiziert wurden (Köhler *et al.*, 1995). Für die Untersuchungen in transgenem Tabak wurden die Promotorfragmente vor das Reportergen der β -Glucuronidase (GUS) kloniert. In allen Konstrukten ist die TATA-Box des *GapC4* Promotors enthalten, da sie möglicherweise im Rahmen der Transkription ein generelles Element darstellt. Insgesamt wurden neun 5'- und acht 3'-Deletionskonstrukte in 133 unterschiedlichen transgenen Tabaklinien unter aeroben und anaeroben (48h) Bedingungen auf GUS-Aktivität untersucht. In Tabelle 1 sind die Daten der quantitativen GUS-Bestimmung zusammengefaßt. Betrachtet man die Werte der aeroben Expression aller transgenen Tabaklinien, so ist im Vergleich zu den Negativkontrollen kein bedeutsamer Unterschied festzustellen (Wildtyp [wt], promotorloses Reportergen [pGUS3], Transformationsvektor ohne Promotor-Reportergen [pOCA28]). Die Werte liegen in einem Bereich von 6 - 49 pmol MU x Min⁻¹ x mg⁻¹ und reflektieren unspezifische Hintergrundaktivität.

Nach anaerober Inkubation zeigen die 5'-Deletionskonstrukte 5'-461, 5'-400 und 5'-300

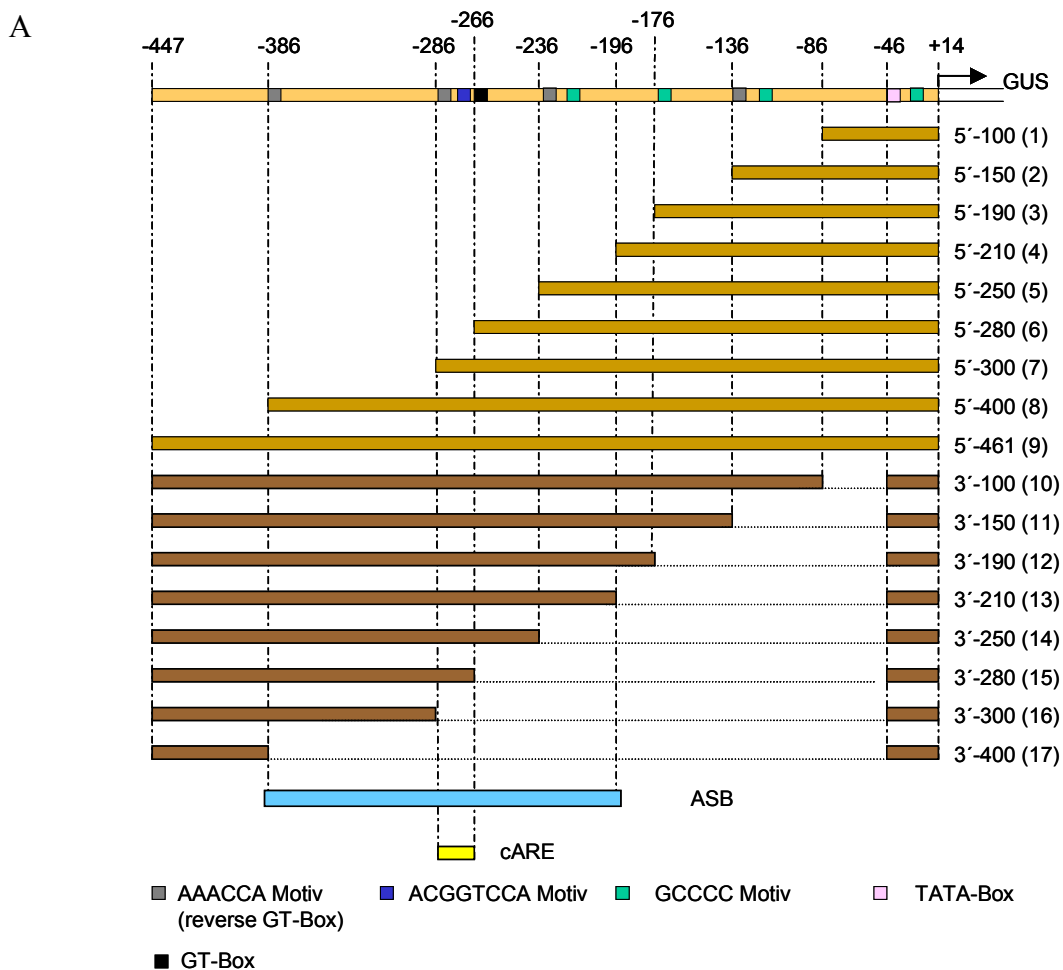
Expressionswerte von 4556 bis 25580 pmol 4-MU x Min⁻¹ x mg⁻¹. Ebenso hohe Expressionswerte werden für die 3'-Deletionskonstrukte 3'-100 bis 3'-280 gemessen (Tabelle 1). Nach der Deletion eines 20bp Bereich von -286 bis -266 sinkt die Expression besonders stark. Die Deletionskonstrukte 5'-280 bzw. 3'-300 zeigen nur noch eine Expression zwischen 870 und 1018 pmol 4-MU x Min⁻¹ x mg⁻¹. Noch etwas schwächer sind die Expressionswerte für die Konstrukte 5'-250, 3'-400 und 5'-190. Allerdings wird der erhöhte durchschnittliche Expressionswert für das 5'-190 Konstrukt besonders stark durch eine Linie mit hoher anaerober Expression beeinflusst. Acht von neun untersuchten Linien zeigen nur geringfügig höhere Expression unter anaeroben Bedingungen als unter aeroben (siehe 7.1.1). Alle weiteren Konstrukte liegen im Bereich aerober Expression oder sind geringfügig höher (Tabelle 1). Generell wurde eine hohe Varianz zwischen den unabhängigen Linien je Konstrukt, möglicherweise aufgrund von Positionseffekten der integrierten T-DNA, festgestellt. Die Angaben der Maximal- (Max.) und Minimalwerte (Min.) in der Tabelle 1 verdeutlichen dies.

Tabelle 1: Quantitative Auswertung der transgenen Tabaklinien:

		Aerobe GUS Expression in pmol 4-MU x Min ⁻¹ x mg ⁻¹			Anaerobe GUS Expression in pmol 4-MU x Min ⁻¹ x mg ⁻¹		
Konstrukt	Anz. d. Linien	Ø Wert	Max. Wert	Min. Wert	Ø Wert	Max. Wert	Min. Wert
5'-461	8	25	63	6	25 580	55 558	4 553
5'-400	8	18	47	2	7 268	15 487	359
5'-300	6	6	13	1	4 556	7 694	612
5'-280	9	7	15	2	870	3 165	6
5'-250	8	7	18	2	579	1 756	69
5'-210	8	36	98	4	124	582	5
5'-190	9	12	29	1	300	1 815	4
5'-150	10	26	80	2	36	113	2
5'-100	7	8	18	4	37	118	2
3'-100	7	32	59	13	26 936	80 169	1 062
3'-150	9	49	109	3	9 921	25 920	82
3'-190	9	30	66	5	22 732	47 065	6 019
3'-210	9	30	87	2	11 006	23 215	5
3'-250	9	14	40	3	12 543	38 151	3
3'-280	8	14	37	1	4 430	11 758	78
3'-300	7	9	17	5	1 018	3 522	51
3'-400	9	15	32	5	422	969	64
WT	1	7	-	-	15	-	-
pOCA28	1	3	-	-	6	-	-
pGUS3	1	6	-	-	4	-	-

Deutlicher werden die Deletionseffekte, wenn man die anaeroben Expressionswerte relativ zur Gesamtpromotoraktivität (5'-461) darstellt. Dies ist in Abb. 3 B gezeigt. Die 5'-Deletionen zeigen eine progressive Abnahme der Promotoraktivität in Abhängigkeit der Promotorlänge. Dabei sinkt die Aktivität von 100% (5'-461) nach Deletion der ersten 161 bp auf 18%. Dieser Bereich entspricht im *GapC4* Promotor der Region von -447 bis -286 (Abb. 3 B). Die darauf folgende Deletion im Bereich zwischen -286 und -266 reduziert die Aktivität nochmals um 15% auf 3%. Die Konstrukte 5'-280 und 5'-250 zeigen nur noch marginale Promotoraktivität, während alle weiteren 5'-Deletionskonstrukte keine bis nur geringe Aktivität aufweisen (Abb. 3 B, 0-1%).

Unter den 3'-Deletionen wird keine progressive Abnahme der Promotoraktivität beobachtet. Im Bereich von -46 bis -266 schwankt die Promotoraktivität zwischen minimal 17% und maximal 105% (vergl. Abb. 3 B). Allerdings führt auch hier eine Deletion von 20 bp im Bereich von -266 bis -286 zu einer starken Verringerung der anaeroben Expression von 17% auf 2-5%, ähnlich wie es für die 5'-Deletionskonstrukte 5'-280 und 5'-250 beobachtet wurde. (vergl. 3'-280 und 3'-300 in Abb.3 A und B).



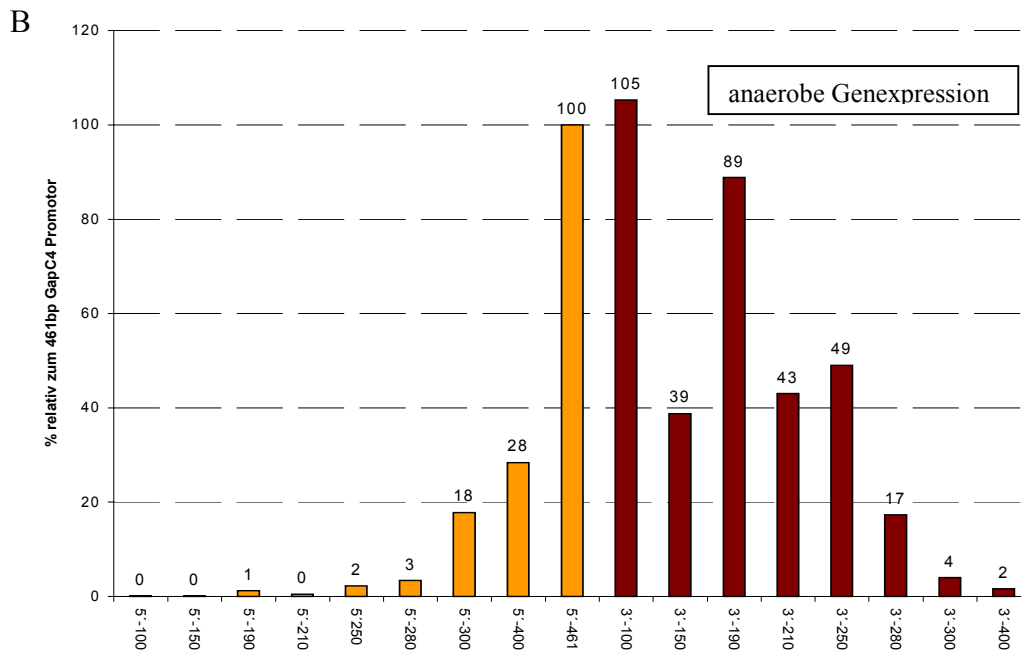


Abb. 3: Untersuchung *cis* regulatorischer Elemente innerhalb des 461bp *GapC4* Promotors in transgenen Tabakpflanzen. A Schematische Darstellung der 5'- und 3'-Deletionskonstrukte vor der *GapC4* TATA-Box und dem GUS Reportergen. Am rechten Rand sind die jeweiligen Namen der Konstrukte angegeben. Neben anaerob spezifischen Elementen sind die im Text beschriebenen essentiellen Bereiche für die anaerobe Expression gekennzeichnet (ASB, cARE). B relative Darstellung der anaeroben Reportergenexpression

Eine andere Art der Darstellung zum Vergleich der anaeroben Expression ist die Angabe von Induktionsraten (Verhältnis anaerober zu aerober Expression). Dieser Wert berücksichtigt neben der absoluten Änderung der anaeroben Expression auch die Änderung der aeroben Expression und beschreibt damit den Effekt, den eine Deletion bewirkt, umfassender. In Tabelle 2 sind die durchschnittlichen Induktionsraten wiedergegeben. Transgene Tabaklinien, die das Reportergenkonstrukt mit der vollständigen Promotorsequenz tragen, zeigen im Durchschnitt eine über 1000-fache Induktion (Tabelle 2: 5'461). Ähnliche Werte wurden auch von (Köhler *et al.*, 1996) beobachtet. Im Anhang sind die Induktionswerte der einzelne Linien aufgelistet (siehe 7.2). Die Kombination aller Ergebnisse aus den 5'- und 3'-Deletionsexperimenten ermöglichen die Beschreibung eines anaerob sensitiven Bereichs (ASB). Demnach ist ein Bereich von -386 bis -196 für die anaerobe Expression essentiell (vergl. Tabelle 1, Tabelle 2 und Abb. 3 A, B: Konstrukte 5'-400 bis 5'-210, sowie 3'-100 bis 3'-300). Innerhalb dieses Bereichs ist die Deletion einer 20bp Sequenz besonders bedeutsam für die anaerobe Expression (cARE = core ARE, -286 bis -266). Allerdings enthalten auch flankierende Bereiche Elemente, die für die anaerobe Expression wichtig sind, aber nur einen geringfügigen Einfluß im Vergleich zum ASB auf die Gesamtpromotoraktivität haben

(vergleiche 3'-400 in Tabelle 2).

Tabelle 2: Durchschnittliche Induktionsraten transgener Tabaklinien mit unterschiedlichen Deletionskonstrukten des *GapC4* Promotors

Konstrukt	Ø Induktion	Konstrukt	Ø Induktion
5'-461	1.292	3'-100	903
5'-400	566	3'-150	393
5'-300	832	3'-190	940
5'-280	90	3'-210	554
5'-250	115	3'-250	1352
5'-210	3	3'-280	448
5'-190	23	3'-300	125
5'-150	2	3'-400	31
5'-100	4	wt	1

3.1.2 Untersuchung organspezifischer Expressionsmuster nach Deletionen im anaerob sensitiven Bereich

Zur Untersuchung organspezifischer Expressionsmuster der transgenen Tabaklinien wurde die Methode der histochemischen Gewebefärbung eingesetzt (Jefferson *et al.*, 1987). Diejenigen Gewebe, in denen der Promotor aktiv ist, exprimieren β -Glucuronidase, welches das farblose Substrat X-Gluc umsetzt. Das Gewebe färbt sich blau.

Es wurden die Tabakkeimlinge aller Linien unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht, wobei in der Abb. 4 nur solche gezeigt werden, deren *GapC4* Promotorfragmente den ASB entweder noch beeinhalteten (5'-300, 5'-280 sowie 3'-280 und 3'-300) oder direkt darauf folgen (5'-210). Unter aeroben Bedingungen konnte in den meisten Linien keine Blaufärbung nachgewiesen werden. Nur solche Linien, in denen sich das ASB noch im Promotorfragment befindet, zeigten eine leichte Blaufärbung im Leitbündelsystem der Wurzel (Abb. 4, b). Möglicherweise ist diese Aktivität auf mangelnde Diffusion des Sauerstoffs durch die Wurzelendodermis (Casparischer Streifen) zurückzuführen. Der Casparische Streifen umgibt ringförmig das Leitbündelsystem mit Zellen, deren Zellwände sekundär verdickt und suberinhaltig sind. Er stellt eine Diffusionsbarriere sowohl für den Gasaustausch als auch für

den apoplastischen Stofftransport dar.

Unter anaeroben Bedingungen wurden besonders die Organe Blatt, Sproß und Wurzel auf GUS-Aktivität untersucht. Wie schon für den 461bp Promotor gezeigt wurde (Köhler *et al.*, 1996), ist der Keimling in allen Organen tief blau gefärbt. Dieser Phänotyp konnte mit den Linien 5'-461, 5'-400, 5'-300 (Abb. 4c-d) sowie den Linien 3'-100, 3'-150, 3'-190, 3'-210, 3'-250, 3'-280 reproduziert werden (Abb. 4 i-j). Innerhalb des ASB führt die Deletion des cAREs zwischen -286 und -266 zu einem starken Intensitätsverlust der Blaufärbung, der alle Organe gleichermaßen betrifft (vergl. 5'-300 und 5'-280 in Abb. 4 c-d und e-f). Dieser Phänotyp kann auch durch die komplementären 3'-Deletionskonstrukte dargestellt werden (Abb. 4i-j und k-l). Linien, bei denen in quantitativen Untersuchungen durchschnittliche Expressionwerte von weniger als $422 \text{ pmol } 4\text{-MU} \times \text{Min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ gemessen wurden, konnten durch diese Methode nicht als GUS-positiv nachgewiesen werden (5'-210 Abb. 4 g-h, 5'-190, 5'-150, 5'-100, sowie 3'-400).

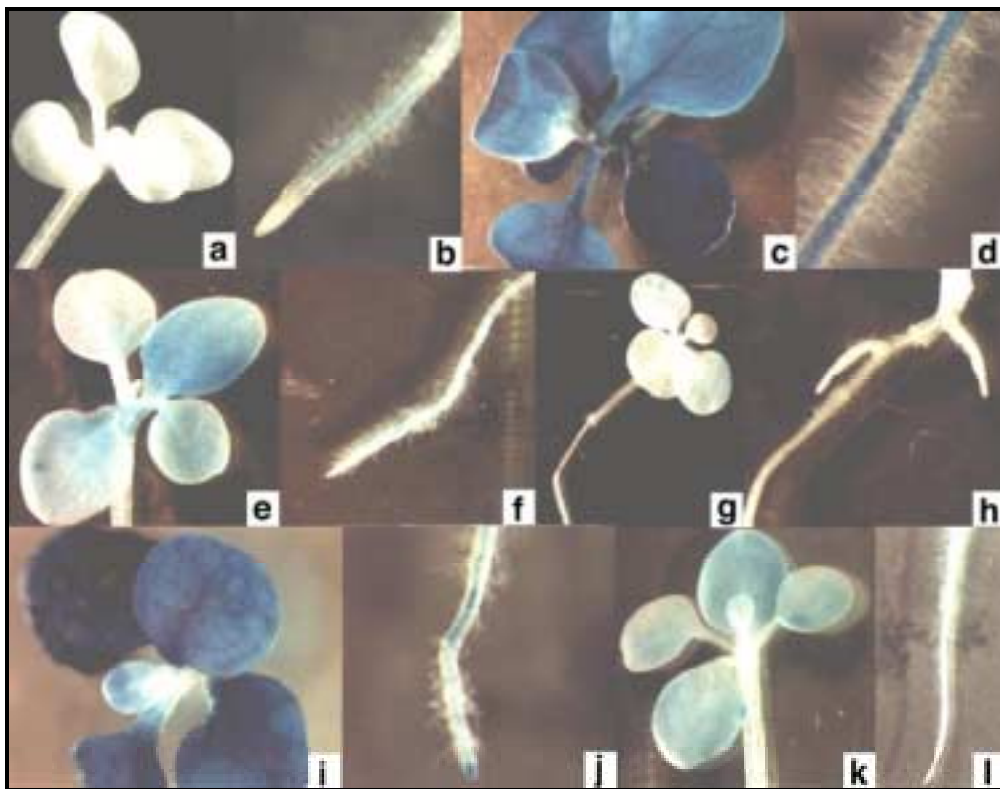


Abb. 4: Auswirkung von Deletionen im ASB auf die gewebsspezifische Expression. a-b: 5'-300 aerob; c-d 5'-300 anaerob; e-f: 5'-280 anaerob; g-h: 5'-210 anaerob; i-j 3-280 anaerob; k-l: 3'-300 anaerob

3.2 Funktionelle Analyse des 20bp cAREs

Das kleinste funktionell charakterisierte Element im ASB ist das 20bp cARE zwischen -286 und -266. Die Deletion dieses Elements führt zu stark verringerter anaerober Reportergenaktivität (Tabelle 1, Abb. 3 B und Abb. 4: 5'-300 und 5'-280 bzw. 3'-280 und 3'-300). Zur Identifizierung anaerob regulierender oder expressionsverstärkender Elemente wurde dieser Bereich einer funktionellen Untersuchung in transgenem Tabak unterzogen. Interessanterweise befinden sich innerhalb des cARE zwei Motive, wie sie auch in Promotorbereichen anderer anaerob induzierter Gene gefunden wurden: ein Motiv ist die GT-Box, die auch in reverser Orientierung (AAACCA) vorliegt und in funktionellen Promotorregionen anaerob induzierter Maisgene, wie der Alkoholdehydrogenase 1 (*Adh1*, Walker *et al.*, 1987) und der Aldolase (*Ald*, Dennis *et al.*, 1988) vorkommt. Das zweite Motiv ist ein 8 bp Element (ACGGTTCCA), welches in den Promotorregionen der coregulierten Maisgene *Adh1* und *Adh2* vorkommt und in DMS „Footprint“-Analysen als gemeinsame Proteininteraktionsstelle charakterisiert werden konnte (Paul und Ferl, 1991).

Um zu untersuchen, ob das cARE allein die anaerob spezifische Expression des GUS-Reportergens vermitteln kann, wurde ein 50bp Fragment (-299/-249) amplifiziert, welches das cARE zentral umschließt. Dieses 50bp Element wird im folgenden als ARE (Anaerob Response Element) bezeichnet. Es wurden 2 Konstrukte, die das ARE in unterschiedlicher Orientierung vor der TATA-Box des *GapC4* Promotors und dem GUS-Reportergen tragen, hergestellt und stabil in Tabak transformiert (Abb. 5A). Auf diese Weise wurde untersucht, inwieweit das ARE allein in der Lage ist, anaerob induzierte Expression zu vermitteln, und ob die Aktivität orientierungsabhängig ist.

In der Tabelle 3 werden die Ergebnisse der Untersuchung gezeigt. Es wurden insgesamt 11 unabhängige Linien untersucht, die das ARE in der ursprünglichen Orientierung (ARE_F) und 6 Linien, die das ARE in reverser Orientierung (ARE_R) tragen. Beide Linien zeigen unter aeroben Bedingungen niedrige Expressionswerte, die vergleichbar mit dem 461bp *GapC4* Promotor (5'-461) und dem promotorlosen Reportergenkonstrukt (pGUS3) sind (Tabelle 3).

Unter anaeroben Bedingungen wurde ein durchschnittlicher Substratumsatz für die ARE_F Linien von 361 pmol 4-Mu x min⁻¹ x mg Protein⁻¹ gemessen. Dies entspricht bezogen auf den 461bp *GapC4* Promotor 1,3%. Für die ARE_R Linien wurde mit einem anaeroben Substratumsatz von durchschnittlich 13 pmol 4-Mu x min⁻¹ x mg Protein⁻¹ kein nennenswert höherer Wert als unter aeroben Bedingungen (12 pmol 4-Mu x min⁻¹ x mg Protein⁻¹)

gemessen. Ein Vergleich der Substratumsätze mit der promotorlosen Kontrolle pGUS3 zeigt für die ARE_R Linien im Gegensatz zu den ARE_F Linien keine signifikante Expressionssteigerung (Tabelle 3).

Tabelle 3: Quantitative Auswertung transgener Tabaklinien, die das ARE in unterschiedlicher Orientierung tragen

Konstrukte	Anzahl Linien	Aerobe GUS Expression in pmol 4-MU x min ⁻¹ x mg ⁻¹			Anaerobe GUS Expression pmol 4-MU x min ⁻¹ x mg ⁻¹		
		Ø Wert	Max. Wert	Min. Wert	Ø Wert	Max. Wert	Min. Wert
ARE _F -GUS	11	55	249	2	361	1225	12
ARE _R -GUS	6	12	36	4	13	31	9
5'-461	8	25	63	6	25 580	55 558	4 553
pGUS3	1	6	-	-	4	-	-

Durch die histochemische Anfärbung der ARE_F Linien beobachtet man nur eine sehr schwache Blaufärbung, die nicht immer in allen Organen auftritt. Generell ist die Anfärbung in den Blättern am intensivsten. In Abb. 5 B ist ein Beispiel der ARE_F Linien gezeigt. Detaillierte Angaben zur Expression der einzelnen Linien werden im Anhang 7.4 gezeigt.

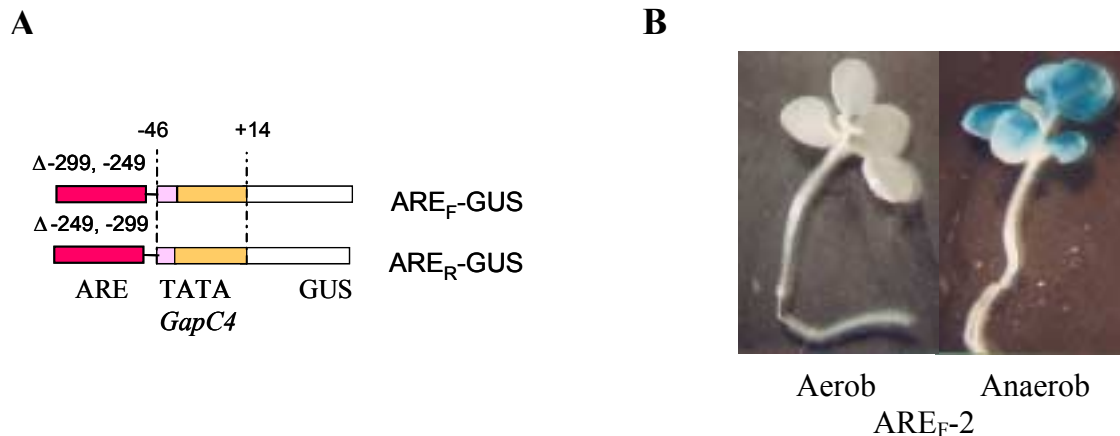


Abb. 5: ARE in transgenem Tabak: A schematische Darstellung des AREs in unterschiedlichen Orientierungen vor der *GapC4* TATA-Box und dem GUS Reportergen. B histochemische Anfärbung eines transgenen Tabakkeimlings nach Inkubation unter aeroben und anaeroben (48h) Bedingungen. ARE_{F,R}: unterschiedliche Orientierung des AREs.

3.3 Untersuchung transienter Genexpression in Tabakblättern

3.3.1 Einfluß des ARE-Tetramers auf die Promotoraktivität

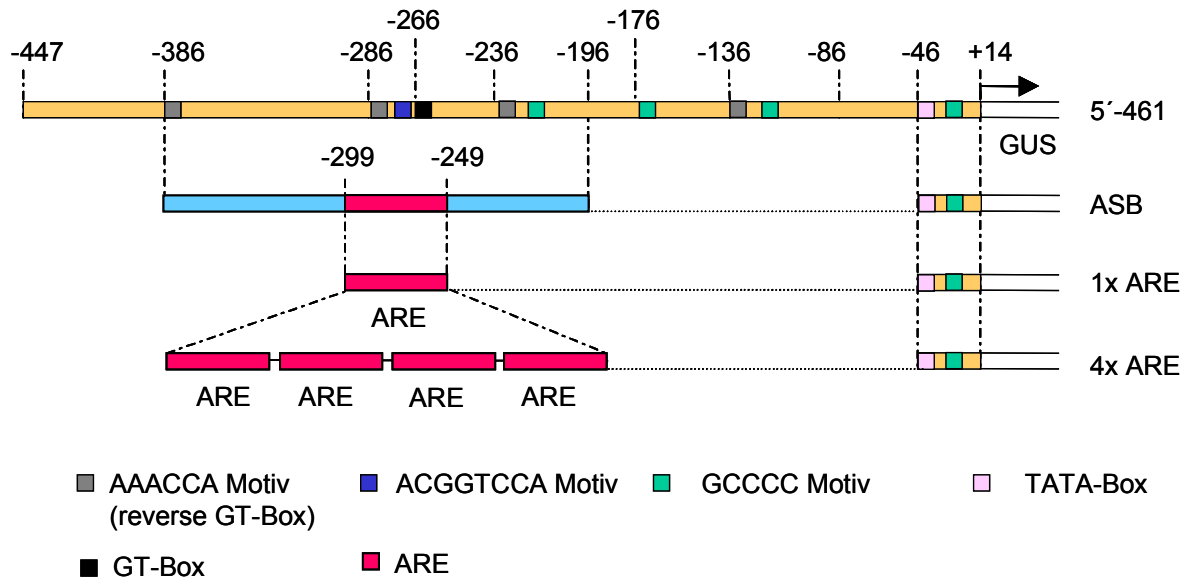
Die zuvor bestimmte, relativ schwache Promotoraktivität des ARE Elementes im Vergleich zum 461bp *GapC4* Promotor könnte abhängig von der Häufigkeit bestimmter *cis*-Elemente innerhalb des *GapC4* Promotors sein, die gemeinsam in synergistischer Weise die Expression beeinflussen, jedoch nur einmal im ARE auftreten. Die progressive Abnahme der anaeroben Expression, wie sie für die Deletionen vom 5'-Ende beobachtet werden konnte, könnte ein Hinweis auf einen solchen Effekt sein (Abb. 3, 5'-Deletionen). Möglicherweise trägt auch die Redundanz bestimmter *cis*-Elemente zu der starken Expression durch den 461bp Promotor bei. Vergleiche potentiell funktioneller *cis*-Elemente innerhalb des AREs mit denen des ASB und des *GapC4* -Promotors zeigen eine insgesamt 3-fache (bezogen auf den ASB) bzw. 4-fache (bezogen auf den *GapC4* Promotor) Wiederholung des AAACCA-Motivs (vergleiche Abb. 6 A). Dieses Motiv ist häufiger Bestandteil anaerob induzierter Gene (Hoeren *et al.*, 1998). In dem folgenden Experiment soll überprüft werden, ob ein synergistischer Effekt durch Multimerisierung des AREs hervorgerufen werden kann. Aus anderen eukaryotischen Promotorsystemen sind solche Effekte bereits bekannt (Burley und Roeder, 1996; Stathopoulos und Cyert, 1997).

Die 50bp ARE-Sequenz wurde zu einem Tetramer multimerisiert und vor die *GapC4* -TATA-Box und das GUS-Reportergen kloniert (Abb. 6 A, 4xARE). Als Kontrollen wurden das ARE und der ASB eingesetzt, die ebenfalls vor die *GapC4* TATA Box und das GUS Reportergen kloniert wurden (Abb. 6A, 1xARE und ASB). Mit diesen Konstrukten wurden junge Tabakblätter transient transformiert (Beschluß mit der Partikelkanone, siehe 2.11.2) und auf Reportergenaktivität unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht.

Unter aeroben Bedingungen wurden Promotoraktivitäten im Bereich zwischen 8 und 14% für alle Konstrukte gemessen (relativ zur anaeroben Promotoraktivität des 461bp *GapC4* Promotor: 5'-461, Abb. 6 B). Diese basale Promotoraktivität stimmt mit älteren Daten transient transformierter Maiszellen mit dem 461bp *GapC4* Promotor überein (7% ,Köhler *et al.*, 1995).

Unter anaeroben Bedingungen vermittelt das ARE (1xARE) etwa doppelt so hohe Expression wie sie unter aeroben Bedingungen beobachtet wurden. Relativ zum 461bp *GapC4* Promotor

A



B

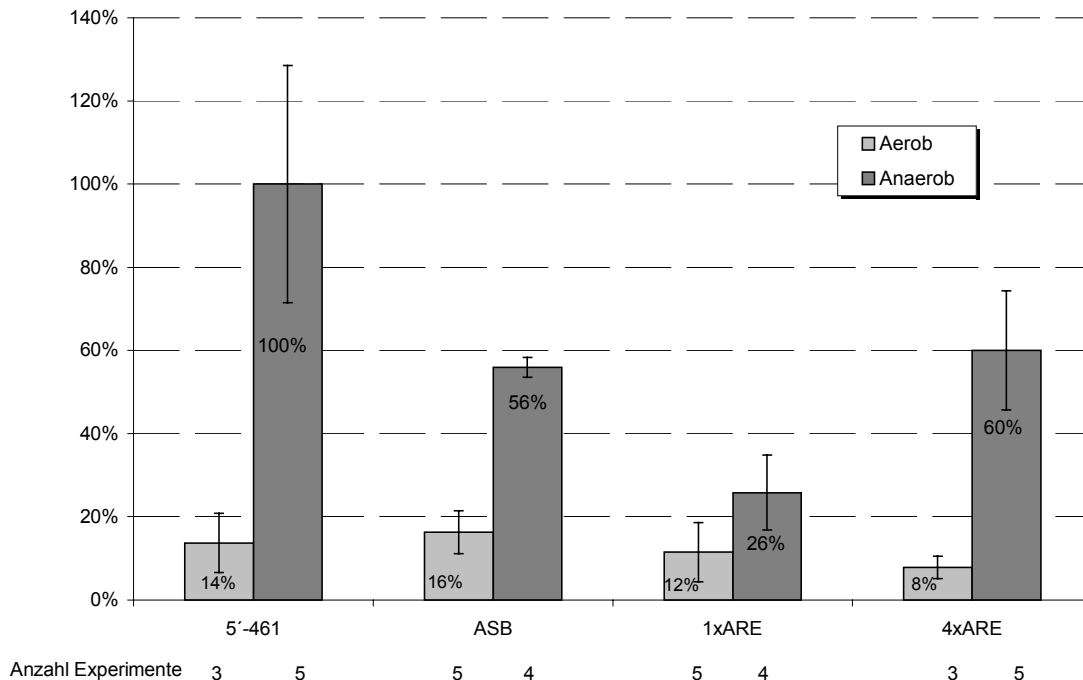


Abb. 6: Einfluß des ARE Tetramers auf die Promotoraktivität: A Schematische Darstellung des AREs, des ARE Tetramers, sowie des ASB und dem 461bp-*GapC4* Promotor. B Ergebnisse der transienten Untersuchungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen (24h). Die Anzahl der unabhängig von einander durchgeführten Experimente ist unter den jeweiligen Konstrukten angegeben. Die Daten sind relativ zur anaeroben Expression des 461bp Promotors gezeigt.

(5'-461) sind dies 26%. Das ARE Tetramer vermittelt dagegen 60% des 461bp *GapC4* Promotors und ist vergleichbar mit der anaeroben Aktivität des ASB (Abb. 6 B).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Multimerisierung des AREs zu einer insgesamt höheren Promotoraktivität führt. Möglicherweise steht die Anzahl der Wiederholungen des AREs in Zusammenhang mit den wiederholten AAACCA Motiven im ASB. Allerdings scheinen noch weitere Motive oder Distanzen zwischen den Motiven einen Einfluß auf die Gesamtpromotoraktivität des 461bp *GapC4* Promotors zu haben, da trotz gleicher Anzahl an AAACCA Motiven im 4xARE nur etwa 60% der möglichen Promotoraktivität erreicht wurde.

3.3.2 Funktionelle Identifizierung *cis* regulatorischer Elemente

Für die Kartierung eines Bereichs, der die anaerobe Promotoraktivität beeinflusst, wurden Mutationen in das 4xARE eingefügt. Abb. 7 zeigt die Mutationen, die in jedem einzelnen Element des 4xARE vorgenommen wurden (Mu-1 bis Mu-5). 1xARE zeigt die Wildtypsequenz. Die fünf verschiedenen Mutanten des 4xARE wurden vor die TATA-Box und das GUS-Reportergen kloniert und mit diesen Konstrukten wurden junge Tabakblätter transformiert (Abb. 8 A). Wenn die Mutationen einen Bereich treffen, der essentiell für die anaerobe Expression ist, sollte dies eine Änderung der anaeroben Expression bewirken.

1x ARE	5' <u>CTTCCGGTGG</u> <u>GCCCGAAACC</u> <u>AGCAACGGTC</u> CAGGGTTTCC AAGGTCCAAC 3'
Mu-1:	5' ACCAATTC TT GCCCGAAACC AGCAACGGTC CAGGGTTTCC AAGGTCCAAC 3'
Mu-2:	5' CTTCCGGTGG TAAATGGGAA AGCAACGGTC CAGGGTTTCC AAGGTCCAAC 3'
Mu-3:	5' CTTCCGGTGG GCCCGAAACC GTAGGATTCA CAGGGTTTCC AAGGTCCAAC 3'
Mu-4:	5' CTTCCGGTGG GCCCGAAACC AGCAACGGTC AGTTTCCCAA AAGGTCCAAC 3'
Mu-5:	5' CTTCCGGTGG GCCCGAAACC AGCAACGGTC CAGGGTTTCC GGTCAAGGA 3'

Abb. 7: Mutationen im ARE: Fett gedruckte Buchstaben zeigen den mutierten Bereich, unterstrichene Elemente haben einen Einfluß auf die anaerobe Genexpression und werden im Text genauer erläutert.

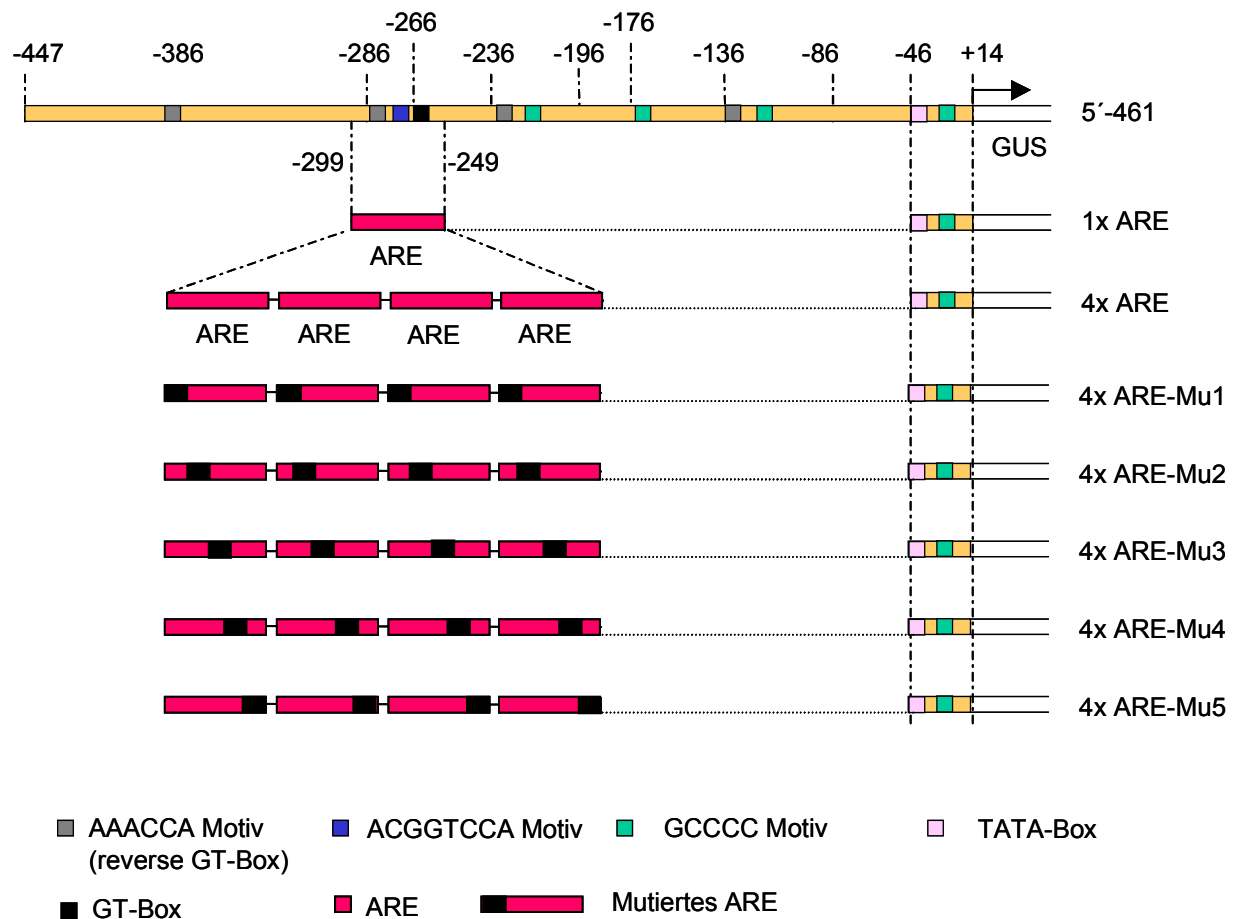
Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 8 B wiedergegeben. Unter aeroben Bedingungen zeigen alle Mutanten etwa eine dem nicht mutierten 4xARE vergleichbare basale Expression (etwa 9-19% im Vergleich zur anaeroben Genexpression des 461bp *GapC4* Promotors; 5'-461).

Unter anaeroben Bedingungen verringert sich Expressionwert durch die Mutation der ersten 10bp auf ca. 32% des 461bp *GapC4* Promotors (vergl. 5'-461 und 4xARE-Mu1). Relativ zum nicht mutierten 4xARE ist dies eine Reduktion von etwa 50%. Die Mutation der nächsten 10bp (4xARE-Mu2) führt zu einer geringfügig stärkeren Reduktion der Expression (55% Reduktion im Vergleich zum 4xARE). 4xARE-Mu3 reduziert die anaerobe Promotoraktivität soweit, dass sie sich nicht von der basalen aeroben unterscheiden läßt. Bei 4xARE-Mu4 und 4xARE-Mu5 ist die Expression wieder auf einem Niveau, das mit dem nicht mutierten 4xARE Element vergleichbar ist.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist die Charakterisierung von zwei funktionellen Bereichen: Ein erster Bereich umfaßt die ersten 20bp (1-20: 4xARE-Mu1, 4xARE-Mu2), in dem Mutationen zu einer Verringerung, aber nicht zu einem Ausfall der anaeroben Expression führen (Abb. 7: 1xARE einfach unterstrichen). Der zweite Bereich (21.-30. bp: 4xARE-Mu3)

ist essentiell für die anaerobe Genexpression (Abb. 7: 1xARE doppelt unterstrichen). Die letzten 20bp (31-50: 4xARE-Mu4, 4xARE-Mu5) haben keinen Einfluß auf die anaerobe Genexpression. Interessanterweise betrifft die Mutation im Bereich ab dem 21. bis zum 30. Basenpaar des AREs das gemeinsame Motiv der *Adh1* und *Adh2* Promotoren aus Mais (ACGGTCCA-Motiv).

A



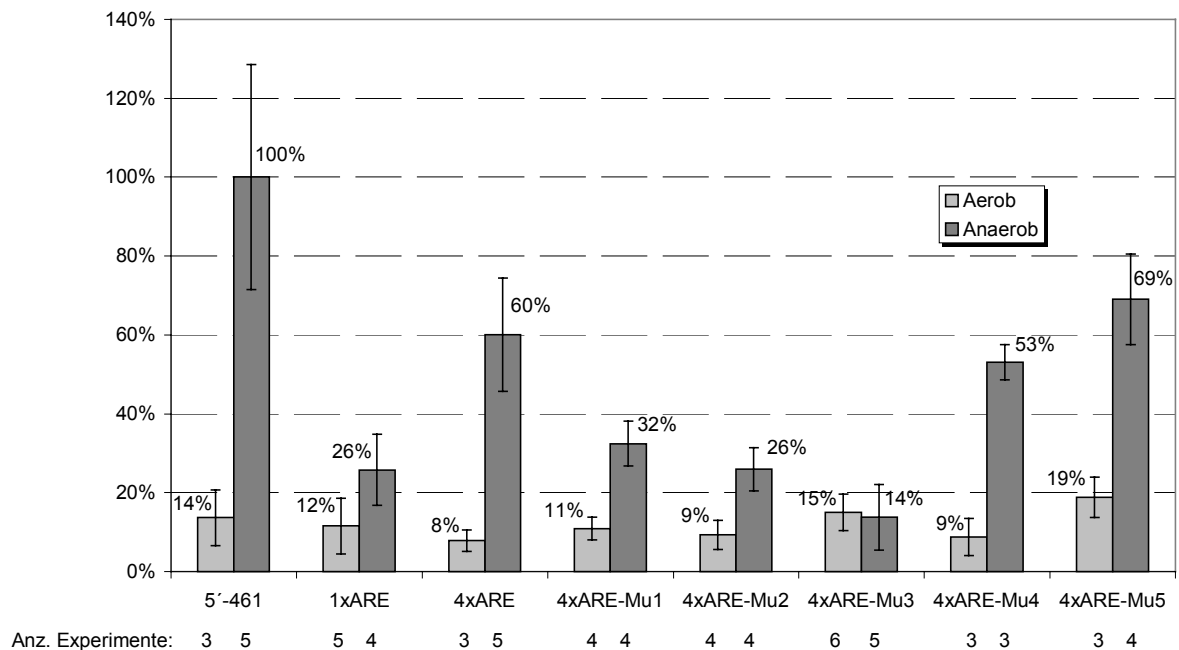
B

Abb. 8: Funktionelle Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente: A Schematische Darstellung des ARE Tetramers, sowie der einzelnen Mutanten und dem 461bp-*GapC4* Promotor. B Ergebnisse der transienten Untersuchungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen (24h). Die Anzahl der unabhängig von einander durchgeführten Experimente ist unter den jeweiligen Konstrukten angegeben. Die Daten sind relativ zur anaeroben Expression des 461bp Promotors gezeigt.

3.4 DNA-Protein Bindungsstudien

Für die biochemische Untersuchung einer Proteinbindungsstelle innerhalb des AREs im *GapC4* Promotor wird die Gel-Shift-Methode (elektrophoretische Mobilitätsuntersuchung von DNA-Proteinkomplexen) eingesetzt. Grundlage dieser Methode ist das physikalische Verhalten von DNA-Protein Komplexen beim Durchlauf einer Matrix im elektrischen Feld. Dabei werden DNA und Kernfaktoren (regulatorische Proteine aus dem Kern einer Zelle) vereinigt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Besitzt die DNA spezifische Bindungsstellen für einen Kernfaktor, so bilden sich DNA-Proteinkomplexe, die im elektrischen Feld unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten haben. Die DNA mit der spezifischen Bindungsstelle ist radioaktiv markiert, sodass sowohl der Komplex, als auch die

ungebundene DNA nach Autoradiographie auf dem Röntgenfilm abgebildet werden können. Eine Aussage über die Spezifität einer DNA-Proteinbindung läßt sich durch die Zugabe von Kompetitoren treffen. Die überschüssige Zugabe von unmarkierten DNA-Molekülen kompetiert im Falle einer homologen Erkennungssequenz innerhalb des DNA Moleküls die radioaktive DNA aus dem DNA-Proteinkomplex. Dieser Komplex wird daher im Autoradiogramm unsichtbar (spezifischer Kompetitor). Bei überschüssiger Zugabe von heterologer DNA bezüglich der Erkennungssequenz kann die radioaktiv markierte DNA aus dem DNA-Protein Komplex nicht kompetiert werden. Im Autoradiogramm bleibt der Komplex sichtbar (unspezifischer Kompetitor).

Der Einsatz dieser Methode soll zeigen, ob regulatorische Proteine an das ARE binden.

3.4.1 DNA-Protein Bindungsstudien mit dem ARE

3.4.1.1 Kernfaktoren binden spezifisch an das ARE

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob Kernfaktoren in der Lage sind an das ARE zu binden. Dazu wurden Kernrohextrakte (angereicherte Kernproteine) mit dem ARE inkubiert. Die Spezifität dieser DNA-Proteinbindung wurde mit unmarkierter ARE-Sequenz als spezifischer Kompetitor und einem 50bp Fragment aus dem Polylinker des Plasmids pUC19 bzw. mit polymeren dIdC (alternierende desoxy Inositol- und Cytosinreste) als unspezifischen Kompetitor überprüft. Ferner wurde untersucht, ob die Kernfaktoren unter aeroben Bedingungen oder spezifisch unter anaeroben Bedingungen an das ARE-Element binden. In Abb. 9 sind die Ergebnisse gezeigt.

Abb. 9 a zeigt die Untersuchungen mit aeroben Kernextrakten. Es bildet sich ein spezifischer Komplex (C1), der durch die Zugabe des spezifischen Kompetitor (Cmp.1 = ARE) verdrängt werden kann, jedoch nicht durch die Zugabe der unspezifischen Kompetitoren (dIdC, pUC19). Die Untersuchung anaerob induzierter Kernproteine ist in Abb. 9 b dargestellt. Es konnte ein zusätzlicher Komplex beobachtet werden (C2). Dieser Komplex ist anaerob-spezifisch und, wie durch die Zugabe der Kompetitoren gezeigt, ARE spezifisch. Im Vergleich zum C1-Komplex ist die Intensität des C2-Komplexes deutlich geringer. Ob dies ein quantitativer Effekt oder ein Effekt der Affinität des Kernfaktors zur ARE-Sequenz ist, kann durch dieses

Experiment nicht eindeutig beurteilt werden. In beiden Fällen (C1 und C2) ist die 50 bis 100-fache Zugabe des spezifischen Kompetitors (Cmp.1) ausreichend, um beide Komplexe zu kompetieren. Durch die Zugabe von 100 bis 500-fachem Überschuß an unspezifischen Kompetitor (dIdC, pUC19) wird keiner der Komplexe beeinträchtigt. Allerdings beeinflusst die Zugabe des unspezifischen Kompetitor dIdC die Intensität der C2 Komplexes im Vergleich zu pUC19 stärker. Jedoch ist bei zunehmenden Überschuß an dIdC keine weitere Abschwächung der Intensität zu beobachten. Möglicherweise sind G/C-reiche Erkennungssequenzen an der Bildung des C2-Komplexes beteiligt. Letztendlich lassen sich 2 DNA-Proteinkomplexe definieren: ein konstitutiv bindender C1-Komplex und ein anaerob-spezifischer C2-Komplex.

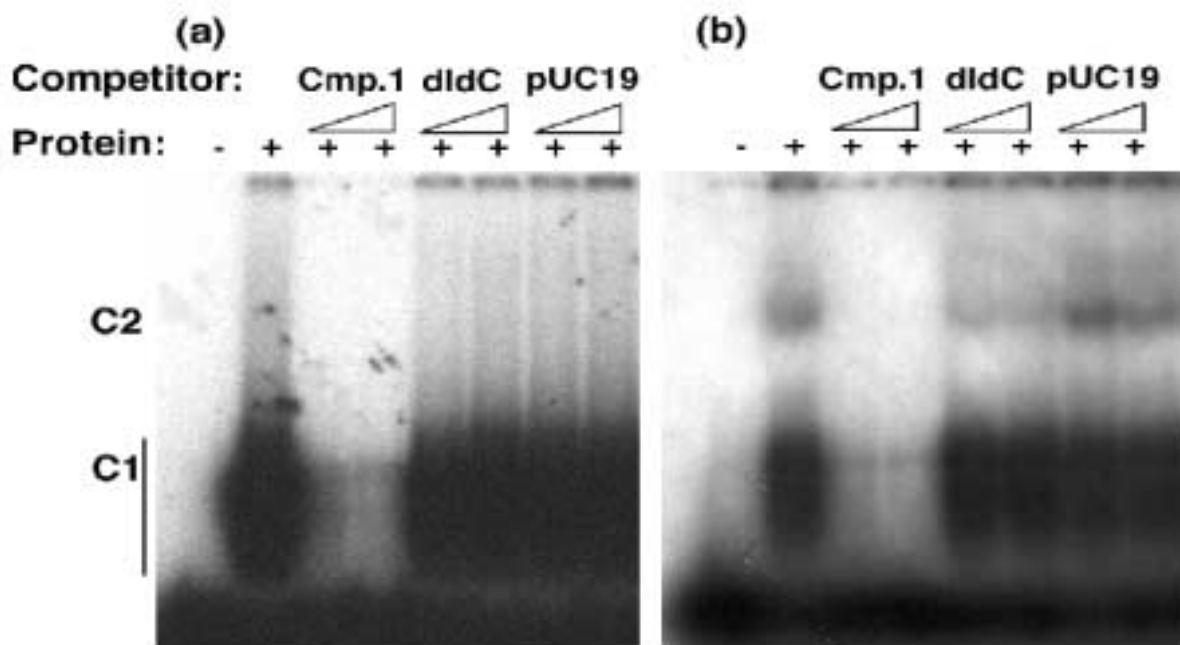


Abb. 9: Gel-Shift zum Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen mit dem ARE unter aeroben (a) und anaeroben (b) Bedingungen. C1 und C2 beschreiben die beiden Protein-DNA Komplexe. Die Kompetitoren wurden in 50 bzw. 100-fachen molarem Überschuß (spezifischer Kompetitor, Cmp.1), oder 100 bzw. 500-fachen molaren Überschuß (unspezifischer Kompetitor, dIdC, pUC19) hinzugegeben. Experimente ohne Kernprotein sind mit (-) gekennzeichnet und bei Zugabe von Kernextrakten mit (+).

3.4.1.2 Bindungsstelle eines konstitutiv bindenden Kernfaktors an das ARE

Anhand von mutierten AREs als Kompetitoren, sollen die Bindungsstellen der beiden Komplexe besser charakterisiert werden. Die Mutationen sind analog zu denen, die bereits funktionell im transienten Expressionssystem untersucht wurden (siehe dazu Abb. 7). Das Experiment wurde so durchgeführt, dass zunächst eine Inkubation des markierten ARE Fragmentes mit den anaeroben Kernproteinen vorgenommen wurde. Durch Zugabe der anaeroben Kernproteine zum markierten ARE, kommt es zur Komplexbildung von C1 und C2. Die Zugabe des spezifischen Kompetitors (Cmp.1) kompetiert das markierte ARE aus dem Proteinkomplex (Abb. 10).

Entscheidend für die Bestimmung der Bindungsstellen der Proteine an das ARE ist nach Zugabe der mutierten ARE (Abb. 10: Kompetitoren Cmp.1-1 bis Cmp. 1-5) das kompetieren bzw. nicht kompetieren der Proteinkomplexe. Ist durch die eingefügte Mutation eine Bindungsstelle zerstört, kann sich der spezifische DNA-Proteinkomplex mit dem Kompetitor nicht bilden. Dieser Kompetitor konkurriert folglich nicht mehr mit dem markierten ARE-Fragment um den Kernfaktor. Als Resultat bleibt der Komplex sichtbar. Sind Bereiche durch Mutationen betroffen, die nicht essentiell für die Bindung des Kernfaktors an das ARE Fragment sind, konkurriert der Kompetitor mit dem markierten ARE-Fragment weiterhin um den gemeinsamen Kernfaktor. Der Komplex ist im Autoradiogramm nicht mehr zu erkennen.

Abgesehen von der Konkurrenz durch das nicht markierte ARE (Abb. 10: Cmp.1) ist kein weiterer Kompetitor in der Lage, den C2 Komplex zu kompetieren, was bedeutet, dass der C2 Komplex die gesamte ARE Sequenz benötigt, um spezifisch an diese zu binden. Möglicherweise sind an der Bildung des C2-Komplexes mehrere Transkriptionsfaktoren beteiligt, die über das ARE verteilte Sequenzen erkennen und nur dann als Komplex binden, wenn jede Erkennungssequenz erhalten ist. Das Zerstören nur einer Erkennungssequenz verhindert, dass sich der C2 Komplex an dem ARE unter *in vitro* Bedingungen manifestiert.

Für den schnell beweglichen DNA-Proteinkomplex C1 konnte folgendes beobachtet werden: Die Zugabe der Kompetitoren Cmp.1-1 und 1-2, die Mutationen in den ersten 20bp tragen, führt im Vergleich zum nicht mutierten ARE (Cmp.1) und zu den Kompetitoren Cmp. 1-3 bis 1-5 zu keiner Konkurrenz des C1 Komplexes (Abb. 10). Daher ist dieser Bereich notwendig für die Bindung von Kernfaktoren.

Mutationen in den letzten 30bp des AREs sind für die Bindung des C1-Komplexes nicht entscheidend (Abb. 10: Cmp.1-3 bis 1-5).

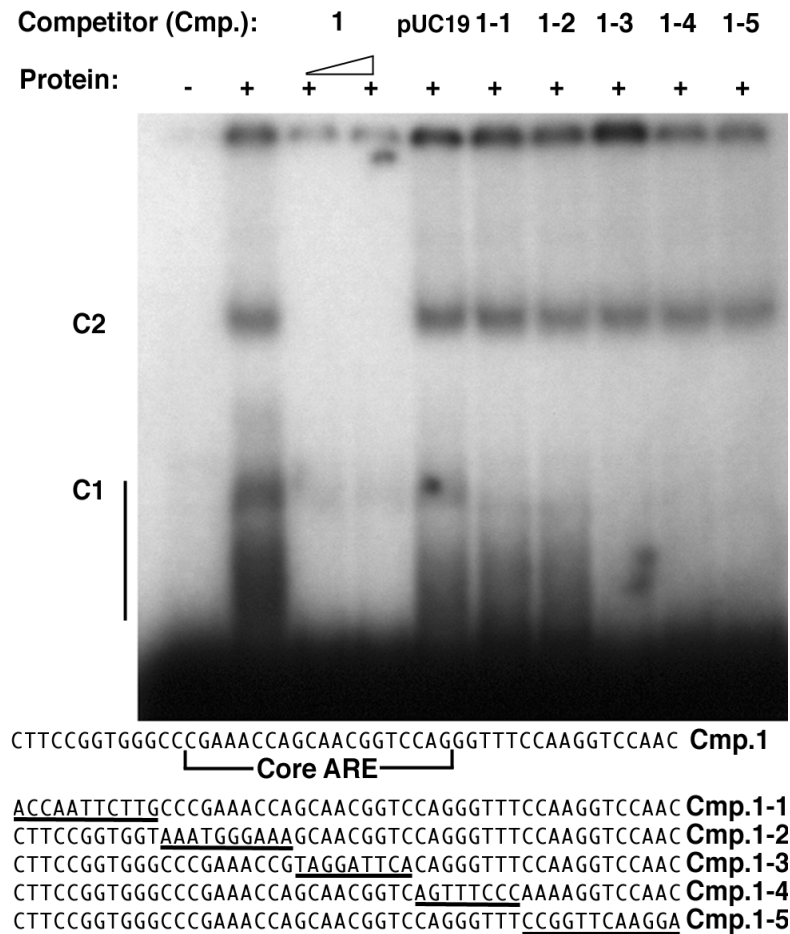
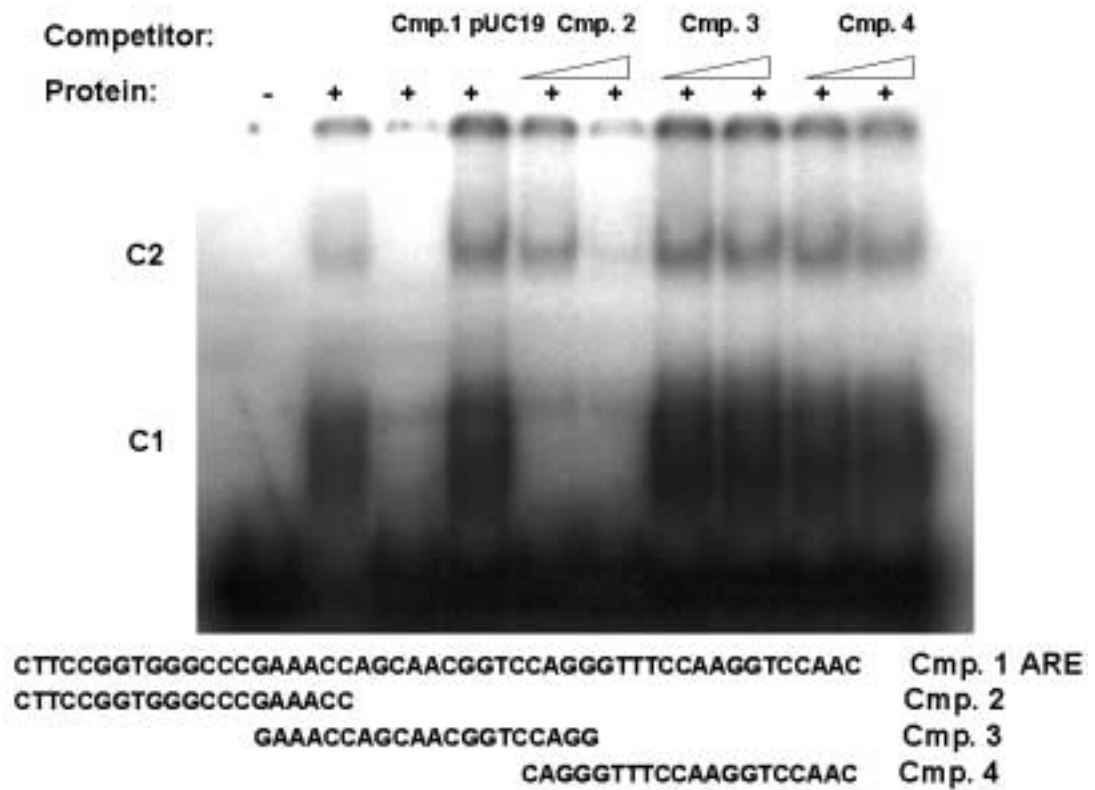


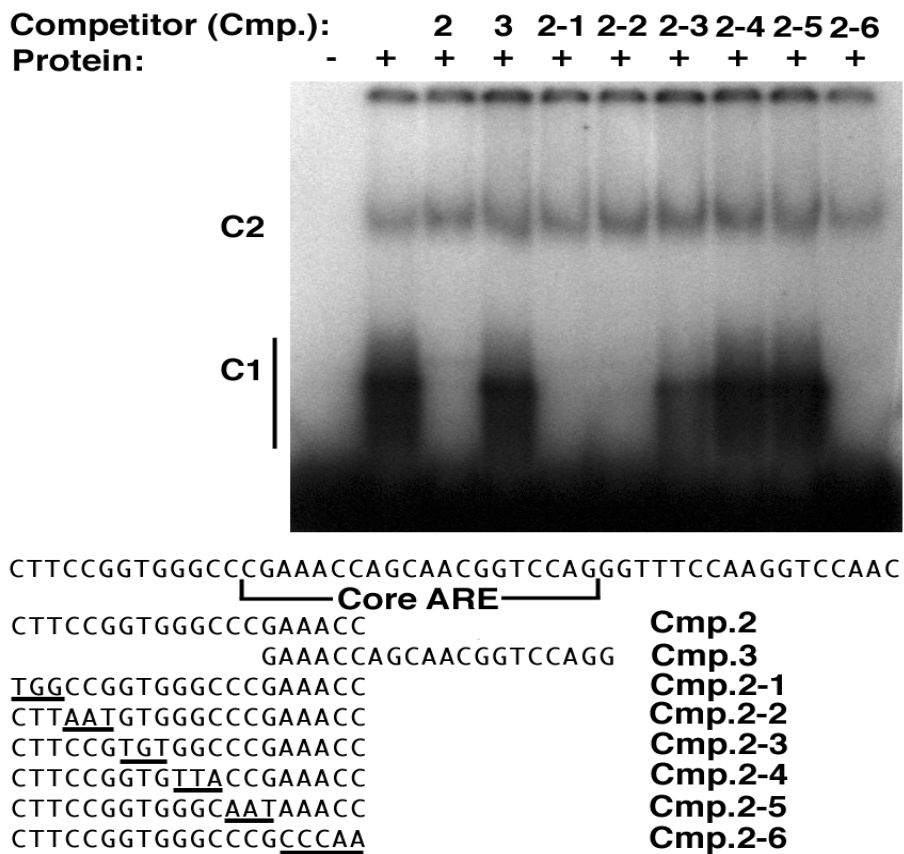
Abb. 10: Bestimmung der Proteinbindungsstelle im ARE (Cmp.1). Generelle Beschreibungen sind in der Legende von Abb. 9 erwähnt. Cmp.1 wurde in 50-fachen molarem Überschuß zugeben, Cmp.1-1 bis 1-5 in 500-fachem molarem Überschuß. Die mutierten Bereiche sind in den Sequenzen von Cmp.1-1 bis Cmp.1-5 unterstrichen. core ARE bezeichnet den 20bp Bereich (siehe Abb. 3a), der für die anaerobe Expression wichtig ist.

In einem anschließendem Experiment sollte gezeigt werden, dass die Bindungsstelle des C1 Komplexes unabhängig vom übrigen Kontext des AREs ist. Dazu wurde das ARE in drei Subfragmente unterteilt, die als Kompetitoren eingesetzt wurden (Abb. 11 A: Cmp.2 bis 4). Nur der Kompetitor Cmp.2 war erfolgreich in der Lage den C1 Komplex zu verdrängen. Cmp.3 und Cmp.4 haben keinen Einfluß auf die Ausbildung des C1 Komplexes (vergleiche Abb. 11 A: Cmp.2 mit Cmp.3 und 4). Der C2 Komplex wurde durch keinen der Kompetitoren spezifisch beeinflusst, obwohl eine höhere Konzentration von Cmp.2 (500-facher molarer Überschuß) die Intensität des C2 Komplexes verringert. Allerdings war dieser Effekt nicht reproduzierbar (vergleiche Cmp.2 in Abb. 11A mit Abb. 11 B und C).

A



B



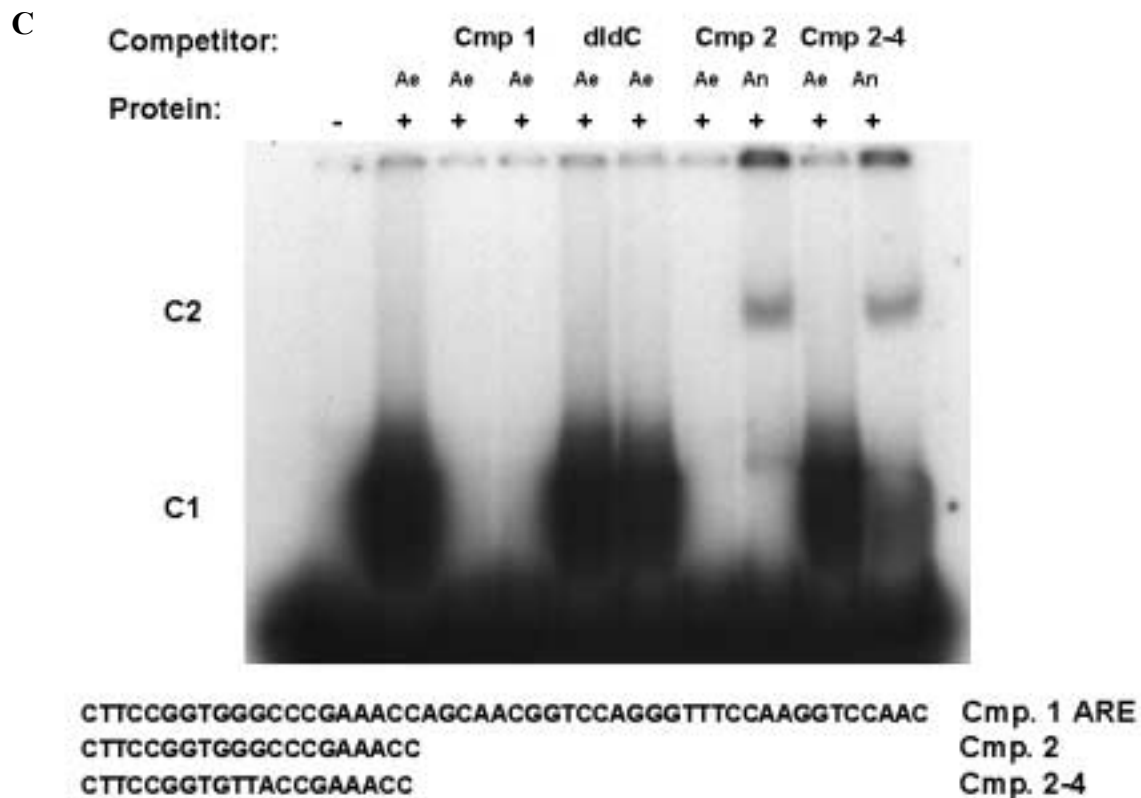


Abb. 11: Erkennungssequenz des C1 Komplexes. Generelle Beschreibungen sind in der Legende von Abb. 9 erwähnt. Kompetitoren (Cmp.) wurden in 100 und 500-fachen (A) bzw. in 500-fachem molarem Überschuß hinzugegeben. Die mutierten Bereiche sind in den Sequenzen unterstrichen. core ARE bezeichnet den 20bp Bereich (siehe Abb. 3a), der für die anaerobe Expression wichtig ist. In A und B werden Experimente mit anaerob induzierten Kernextrakten gezeigt, C zeigt Experimente mit aeroben (Ae) und anaeroben (An) Kernextrakten

Für eine Feinkartierung der C1 Bindungsstelle wurden entlang des 20bp Fragments Cmp.2 3bp Mutationen eingeführt. Diese mutierten Fragmente wurden (Abb. 11B: Cmp.2-1 bis 2-6), zusammen mit dem nicht mutierten 20bp Fragment (Cmp.2), als Kompetitoren eingesetzt. Anaerobe Kernextrakte wurden mit markiertem ARE Fragment inkubiert und die C1 Komplexbildung unter Zugabe der verschiedenen Kompetitoren beobachtet. Cmp. 2 ist als Träger der Bindungsstelle in der Lage, den Komplex C1 zu kompetieren und bestätigt damit die Beobachtungen, wie sie bereits mit den Kompetitoren Cmp.1-1 und Cmp.1-2 in Abb. 10 und Cmp.2 in Abb. 11A gemacht wurden. Cmp. 3 enthält keine C1-bindungsspezifischen Sequenzen und beeinflusst die Komplexbildung nicht (vergleiche Abb. 11A).

Die Mutation der ersten 6 bp hat keinen Einfluß auf die Bildung des C1-Komplexes (Abb. 11 B: Cmp.2-1 und 2-2). Die mutierten Fragmente verhalten sich wie spezifische Kompetitoren, bei denen die Bindungssequenz erhalten ist. Die Mutation der nächsten 9bp (GTGGGCCCCG:

Cmp.2-3 bis 2-5) betrifft allerdings Sequenzen, die für die Bildung des C1-Komplexes essentiell sind. Durch Zugabe dieser Kompetitoren ist eine Kompetition des C1-Komplexes nicht mehr möglich (vergl. mit Cmp.3, der ebenfalls keine C1-bindungsrelevanten Sequenzen besitzt). Cmp.2-6 trägt die Mutation außerhalb der Bindungsstelle. Dieses mutierte Fragment verhält sich wieder wie ein spezifischer Kompetitor.

Abb. 11C zeigt, dass der C1 Komplex, der mit aeroben Kernextrakten gebildet wird, sich genauso spezifisch durch die Kompetitoren Cmp.2 und Cmp.2-4 beeinflussen läßt wie der C1 Komplex aus anaeroben Kernextrakten. Damit ist gezeigt, dass die C1 Komplexe unter aeroben und anaeroben Bedingungen die gleiche Sequenz erkennen.

In den gezeigten Protein-DNA Bindungsstudien konnte für den anaerob spezifischen C2-Komplex keine eindeutige Bindungsstelle identifiziert werden. Der aerob und anaerob bindende C1 Komplex hingegen erkennt spezifisch die Sequenz GTGGGCCCG, wie durch die 3bp Mutationen gezeigt werden konnte (Abb. 11B: Cmp.2-3 bis 2-5). In den transienten Expressionsstudien an Tabakblättern konnte für den am 5'-Ende gelegenen 20bp Bereich eine funktionelle Bedeutung gezeigt werden (siehe 3.3.2). Der C1-Komplex, der sich über der Bindungsstelle GTGGGCCCG bildet, ist ein möglicher Transkriptionsfaktorkomplex, der die anaerobe Expression des Reportergens bzw. des *GapC4* -Gens beeinflusst.

3.4.2 TATA-Box Element

Bisher wurde noch nicht untersucht, inwieweit das TATA-Box Fragment zwischen -45 und -39 des *GapC4* Promotors einen funktionellen Einfluß auf die anaerob spezifische Expression haben könnte. Bisherige Untersuchungen des *GapC4* Promotors (Köhler *et al.*, 1996) und Ergebnisse dieser Arbeit (Tabelle 1) zeigten keine aerobe Expression. Funktionelle TATA-Box Elemente könnten aber basale Expression induzieren. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse transients Expressionsstudien mit Tabakblättern gezeigt, die die Rolle der TATA Box bei der anaeroben Genexpression verdeutlichen.

Für diese Untersuchungen wurde ein am 3'-Ende leicht verkürzter *GapC4* Promotor (Abb. 12A: 3'-100 TATA-Mu) vor das mutierte TATA-Box Motiv kloniert. Die Deletion am 3'-Ende des *GapC4* Promotorfragments umfaßt einen Bereich (-86 bis -46), der unbedeutend für die anaerobe Genexpression ist (vergl. 3.1.1). Das TATA-Box Element (-46 bis -39) wurde durch ein Heptamer aus Thymidinresten ersetzt.

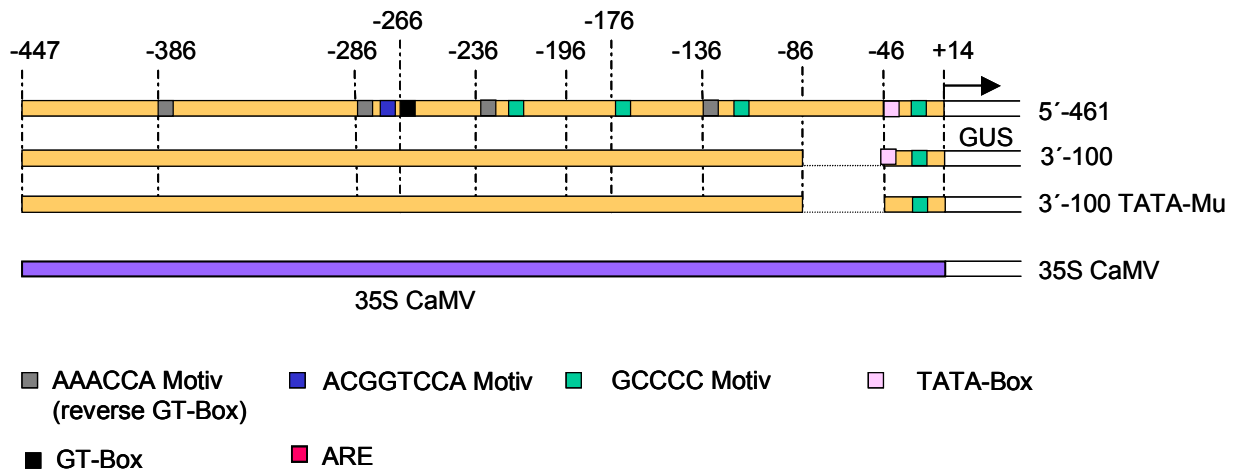
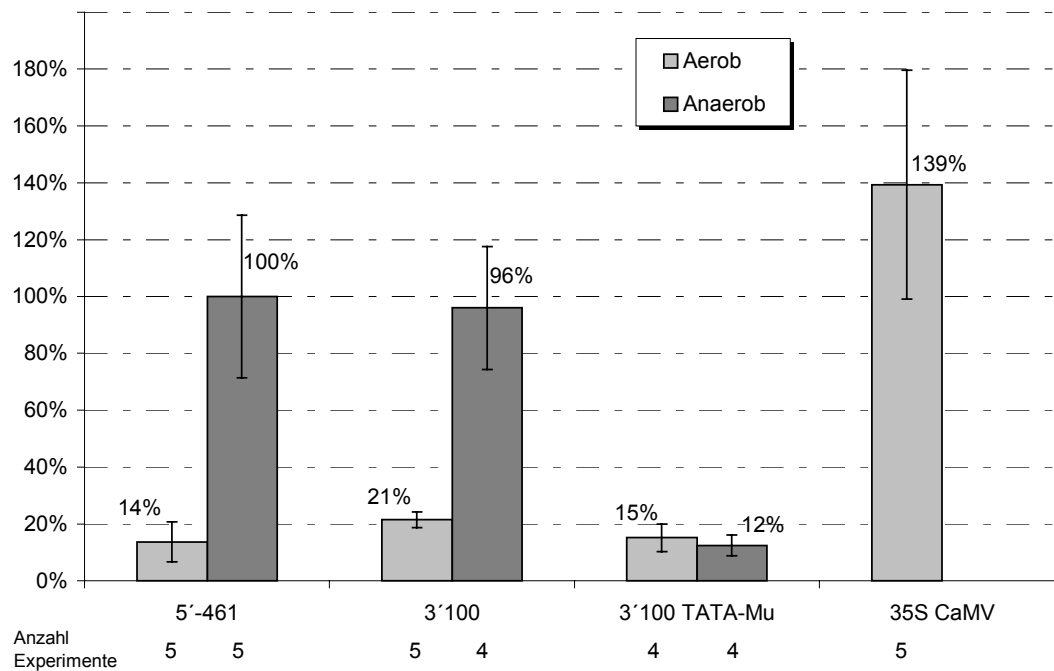
A**B**

Abb. 12: Funktionelle Analyse der TATA-Box A Schematische Darstellung des *GapC4* Promotorkonstrukts mit mutierter (3'-100 TATA-Mu) und nicht mutierter (3'-100) TATA-Box, sowie des CaMV 35S und des 461bp-*GapC4* Promotors. B Ergebnisse der transienten Untersuchungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen (24h). Die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente ist unter den jeweiligen Konstrukten angegeben. Die Daten sind relativ zur anaeroben Expression des 461bp Promotors gezeigt.

Ein weiteres Konstrukt besteht aus dem verkürzten *GapC4* Promotor 3'-100 und dem nicht mutierten TATA-Box Element vor dem GUS-Reportergen (Abb. 12A 3'-100). Beide Konstrukte wurden transient in Tabakblätter transformiert (Beschuß mit Partikelkanone, 2.11.2), die anschließend auf anaerobe und aerobe Genexpression untersucht wurden. Die ermittelte Promotoraktivität wurde mit dem 461bp *GapC4* Promotor (5'-461, anaerob) und dem Blumenkohl-Mosaik-Virus 35S Promotor (CaMV 35S, aerob) verglichen. Abb. 12 B zeigt die Ergebnisse relativ zur anaeroben Expression des *GapC4* Promotors.

Unter aeroben Bedingungen konnte für alle *GapC4* Promotorderivate eine ähnliche Expression im Bereich zwischen 14 und 21% beobachtet werden.. Im Vergleich dazu beträgt die aerobe Promotoraktivität des konstitutiv exprimierenden CaMV 35S Promotors 139%. Die Mutation der TATA-Box hat unter aeroben Bedingungen keinen Einfluß auf die Promotoraktivität.

Unter anaeroben Bedingungen erreicht das Konstrukt ohne Mutation in der TATA-Box annähernd 100% der Reportergenexpression des *GapC4* Promotors (vergleiche 5'-461, 3'-100 in Abb. 12). Bei dem in der TATA-Box mutierten 3'-100 TATA-Mu Konstrukt wurde nur eine Aktivität von 12% gemessen, die damit nicht höher als die aerobe Expression ist.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt, dass die TATA-Box essentiell für die anaerobe Expression des *GapC4* Promotors ist.

3.4.2.1 Anaerob spezifische Interaktion von Kernfaktoren mit der TATA-Box

Nach der funktionellen Analyse der TATA-Box des *GapC4* Promotors wurde die Bindung von Kernfaktoren an das TATA-Box Motiv in Gel-Shift Experimenten untersucht. Aerob und anaerob inkubierte Kernextrakte wurden mit einem 60bp Fragment (TATA-Element: -46 bis +14) des *GapC4* Promotors inkubiert. Dieses Fragment enthält die TATA-Box an Position -45 bis -39. In Abb. 13 werden die Ergebnisse gezeigt.

Unter aeroben (Ae) Bedingungen bildet sich ein Komplex (T1), der spezifisch an das TATA-Box Element bindet. Die Kompetition mit einem nicht markierten 60bp Fragment verdrängt, im Überschuß zugegeben, ebenso wie ein Polymer aus TA-Resten, das markierte 60bp TATA-Box Element aus der Proteinbindung (Abb. 13: TATA Ae, dAdT Ae). Dieser Befund kann bedeuten, dass der T1-Komplex spezifisch an die TATA-Box bindet.

Unter anaeroben (An) Bedingungen binden zusätzlich zum T1 Komplex zwei weitere Protein-

DNA Komplexe spezifisch an das TATA Element (vergleiche Abb. 13: T2 und T3 in Spur 3 und Spur 5). Der T2 Komplex läßt sich vollständig durch überschüssige Zugabe des TA-Polymers kompetieren (Abb. 13, An: dAdT). Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe eines GC Polymers im Überschuß keine kompetitive Wirkung (Abb. 13, An: dGdC). Für den T3 Komplex konnte keiner der eingesetzten Polymere die DNA-Proteinbindung vollständig kompetieren. Möglicherweise handelt es sich hier um einen der TATA-Box benachbarten Komplex, der keine Bindungsspezifität gegenüber der TATA-Box besitzt.

T1 und T2 sind TATA-Box abhängige Komplexe unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit im nativen PA-Gel. Dieses physikalische Verhalten ist abhängig von der Größe und/oder von der unterschiedlichen Ladung der gebundenen Proteine. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint folgende Hypothese möglich: Unter anaeroben Bedingungen binden an den TATA-Box spezifischen Komplex T1 (möglicherweise TATA-Box bindendes Protein: TBP; Roeder, 1996) weitere Faktoren und bilden den größeren Komplex T2 (möglicherweise TFIID, TBP mit assoziierten Faktoren (TAF); Roeder, 1996). Erst nach der Ausbildung von T2 (TFIID) ist eine Aktivierung des Reportergens zusammen mit stromaufwärts gelegenen Aktivatoren möglich.

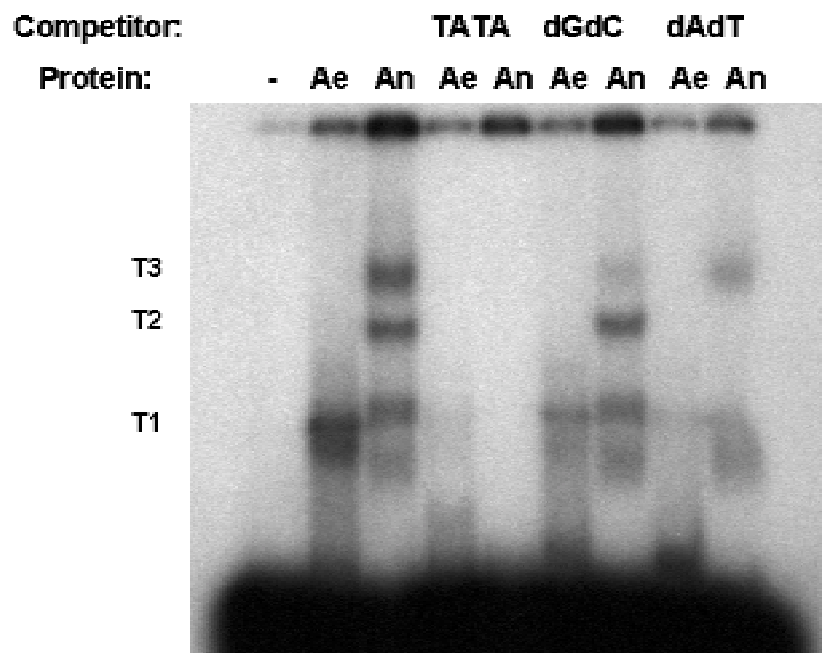


Abb. 13: TATA-Box abhängige DNA-Protein Komplexe. T1 bis T3 sind spezifische Protein-DNA Komplexe mit dem TATA-Box Fragment des *GapC4* Promotors (-46 bis +14). (-) kennzeichnet Reaktion ohne Kernprotein, An bzw. Ae, Zugabe anaerober und aerober Kernextrakte. Kompetitoren: TATA (-46 bis +14 *GapC4* TATA-Box Fragment; dGdC, alternierende Guanodin-/Cytosinreste in doppelsträngiger DNA; dAdT, alternierende Adenosin-/Thymidinreste in doppelsträngiger DNA).

3.5 Isolierung von Transkriptionsfaktoren

Mit Hilfe der folgenden Systeme sollten aufgrund der in dieser Arbeit definierten ARE Sequenz spezifische Transkriptionsfaktoren isoliert werden.

Das ONE HYBRID SYSTEM ermöglicht den *in vivo* Nachweis von DNA-Proteinbindung und die Isolierung DNA bindenden Proteine im eukaryotischen System der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Der South-Western Screen basiert auf der Hybridisierung von cDNA Expressionsbanken mit multimeren *cis*-DNA Sequenzen zur Isolierung spezifischer Transkriptionsfaktoren.

3.5.1 Isolierung von Transkriptionsfaktoren mit dem ONE HYBRID SYSTEM

Das ONE HYBRID SYSTEM ist eine Variante des Hefe TWO HYBRID SYSTEMS und wurde bereits erfolgreich zur Isolierung von Transkriptionsfaktoren eingesetzt (Fields, 1989). Eine cDNA Bank wird als Fusionshybrid mit der GAL4 Aktivierungsdomäne in der Hefe exprimiert. Kodiert die cDNA eine für das *cis*-Element spezifische Bindungsdomäne, so ist das Fusionsprotein aus GAL4 Aktivierungsdomäne und spezifischer Bindungsdomäne in der Lage, Reporterplasmide bestehend aus *cis*-Element / Minimalpromotor und Reporterogen (bspw. HIS3 oder lacZ) *in trans* zu aktivieren. Positive Klone können durch genetische Selektion und colorimetrisch isoliert werden.

Eine eindeutige Selektion durch HIS3 Reporter ist angesichts leichter Hintergrundaktivität schwierig. Die basale Promotoraktivität des HIS3 Reportergens ermöglicht teilweise auch ein Wachstum nicht transaktivierter Hefen auf Histidin-Mangelmedien. Angepaßte Mengen eines Histidinsynthese Inhibitors (3-AT), das dem Selektionsmedium zugefügt wird, inhibiert die basale Expression, beeinflußt aber nicht die induzierte Reporterexpression. Außerdem werden für die Selektion positiver Hefeklone zwei Reporterplasmide (lacZ, HIS3) in einen Reporterstamm transformiert, so dass eine Doppelselektion möglich ist.

Nach der Transformation der Reporterhefe mit der cDNA Bank wird zunächst auf HIS3 positive Kolonien selektiert, die anschließend colorimetrisch im β -Galaktosidase Test auf lacZ-Aktivität überprüft werden. Die Kombination aus lacZ und HIS3 Selektion reduziert die Anzahl „falsch Positiver“ Klone. Zur Identifizierung pflanzlicher Transkriptionsfaktoren wurde das System unter anderem erfolgreich von Kim *et al.*, 1997 eingesetzt. Die angewandte

Methodik einschließlich der Plasmide wurde aus dieser Arbeit übernommen.

Für die Klonierung von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch an das ARE-Element des *GapC4* Promotors binden, wurde die DNA Sequenz zwischen -299 und -249 des *GapC4* Promotors (ARE) vor den Minimalpromotor des HIS3 Reportergens in das centromere pSKI Plasmid bzw. vor den Minimalpromotor des lacZ Reportergens in das episomale Plasmid pYC7 kloniert. Beide Reporterplasmide wurden in den Hefestamm YM954 transformiert, der danach den Reporterstamm darstellt. Dort hinein wurde die hybride GAL4-cDNA Bank transformiert. Die cDNA wurde aus anaerob induzierten, jungen Tabakpflanzen hergestellt. Die cDNA Bank repräsentiert $1,5 \times 10^6$ unabhängige Klone (95% rekombinant). 3×10^6 Hefetransformanten repräsentieren statistisch den 2-fachen Satz der cDNA Bank. Insgesamt wurden daraus 42 HIS3⁺ Kolonien selektiert, die erneut ausplattiert und im „filter lift assay“ auf β -Galaktosidaseaktivität untersucht wurden. 10 der HIS3 positiven Kolonien waren auch lacZ positiv (nur sehr schwache Blaufärbung). Aus allen 10 Kolonien wurde DNA isoliert und die cDNA durch spezifisch flankierende Primer amplifiziert.

Tabelle 4: Selektierte Klone aus dem ONE HYBRID SYSTEM

Gruppe	Klon	cDNA Größe	Homologie in der Datenbank	Referenz
1	OHS-1	1,0 kb	Histon H3-Gen	(Chaubet <i>et al.</i> , 1992)
2	OHS-2	0,8 kb	Gluthationsynthase	(Johnson <i>et al.</i> , 1990)
3	OHS-3	0,9 kb	GF14 omega (GRF2)	(Lu <i>et al.</i> , 1992)
4	OHS-4	1,1 kb	keine	
5	OHS-5	1,0 kb	keine	
6	OHS-6 OHS-7 OHS-8	1,6 kb	Serin-Threonin Protein Kinase CTR1	(Kieber <i>et al.</i> , 1993)
7	OHS-9	1,0 kb	keine	
8	OHS-10	1,4 kb	keine	

Das PCR Produkt wurde entweder einer Klassifizierung durch einen MboI-Verdau unterzogen (bei PCR-Produkten gleicher Länge) oder direkt in ein Sequenzierungsplasmid kloniert (pCR2.01). cDNAs der einzelnen Klassen (8 Klassen) wurden von beiden Seiten ansequenziert und in einem BLAST-Datenbankvergleich untersucht. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4 aufgeführt. Für die meisten isolierten Klone konnte keine hinreichende Homologie in der Datenbank gefunden werden. Außerdem deutet die Vielfalt der

verschiedenen Klone auf keine eindeutige Selektion hinsichtlich eines ARE bindenden Transkriptionsfaktors hin.

In einem weiteren Ansatz sollte überprüft werden, ob die Affinität des AREs zu potentiellen Transkriptionsfaktoren durch Multimerisierung des AREs erhöht werden kann. Dazu wurde eine tetramere ARE Sequenz vor den Minimalpromotor des lacZ Reporters im pYC7 Plasmid kloniert (pYC7-4xARE) und zusammen mit der cDNA-Bank in den Hefestamm YM954 transformiert. Alle Kolonien färbten sich im β -Galaktosidasetest blau. Den gleichen Phänotyp zeigten YM954 Stämme, die nur mit dem pYC7-4xARE Plasmid transformiert wurden. Dies ist ein Hinweis auf endogene Transkriptionsfaktoren der Hefe, die mit erhöhter Affinität das 4x ARE erkennen. Vor diesem Hintergrund erklärt sich auch die unspezifische Selektion beim Einsatz des einfachen ARE. Die schwache Affinität zu einem einzelnen ARE führte nur gelegentlich zu einer Transaktivierung der Reportergene. Innerhalb dieses Grundrauschens konnte keine eindeutige Selektion auf ARE bindende Transkriptionsfaktoren erfolgen.

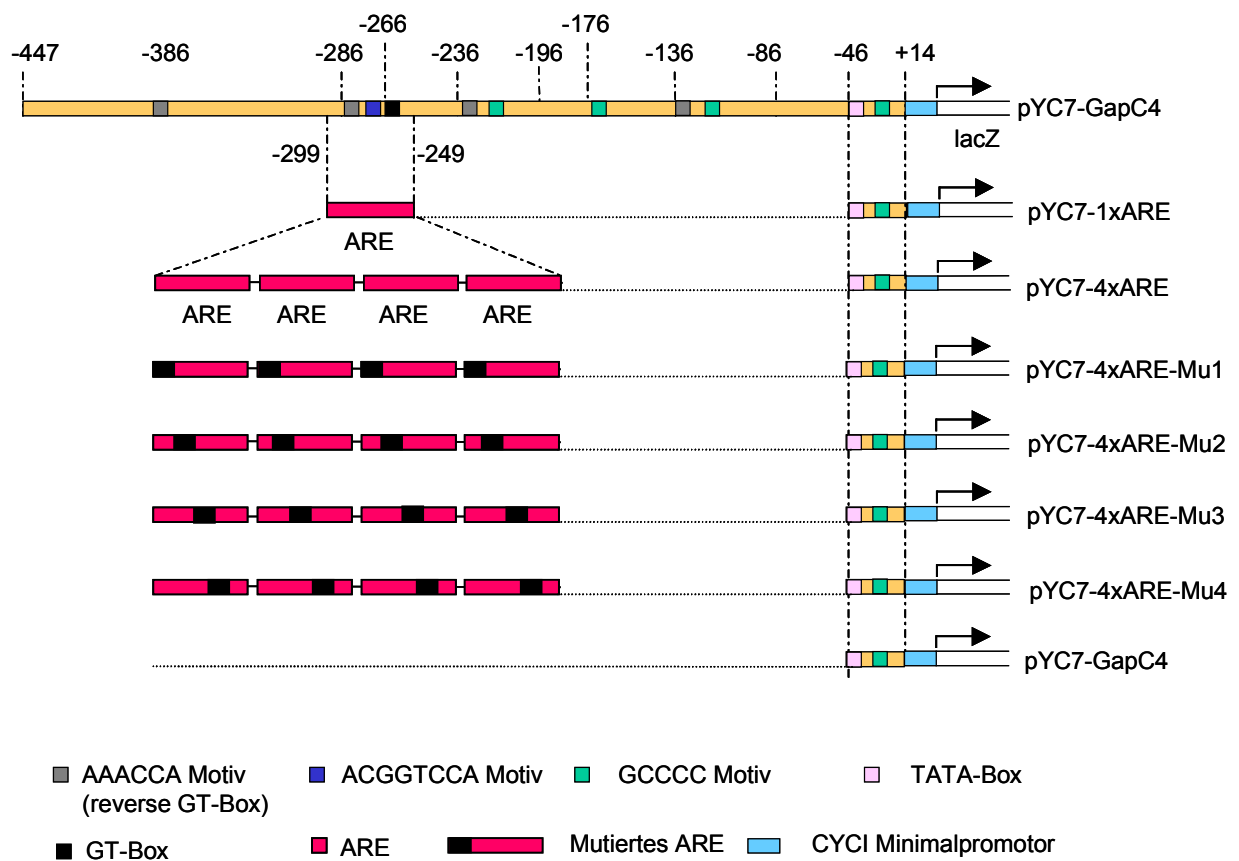
Aufgrund dieses Befundes, nämlich der Aktivierung des lacZ Reporters durch das 4xARE, wurden die Promotoreigenschaften des pflanzlichen *GapC4* Promotors in der Hefe untersucht (Studienarbeit von Sandra Düver).

Dazu wurden quantitative Analysen mit den Konstrukten promotorlos (pYC7), 1xARE (pYC7-1xARE) und 461bp *GapC4* (pYC7-*GapC4*) in dem Hefestamm YM954 durchgeführt (Abb. 14 A) und relativ zu den Werten des 4xARE (pYC7-4xARE) ausgewertet (Abb. 14 B). Für die Konstrukte promotorlos und 1xARE werden nur sehr geringe Expressionswerte gemessen. Sie betragen relativ zu pYC7-4xARE 1-2%. Diese Werte unterstützen die Beobachtungen, die durch den „filter-lift assay“ gemacht wurden (keine Blaufärbung). Im Vergleich dazu erreicht der *GapC4* Promotor 33%. Die Intensität der Blaufärbung konnte allerdings im „filter lift assay“ zwischen pYC7-*GapC4* und pYC7-4xARE nicht mehr unterschieden werden. Ob durch Transkriptionsfaktoren der Hefe ähnliche Sequenzen des AREs benutzt werden, wie sie für Tabak bestimmt wurden, sollte in einer weiteren quantitativen Untersuchung überprüft werden. Analog zu den transienten Tests, wie sie mit den mutierten 4xARE Elementen in Tabakblättern durchgeführt wurden, wurden 4 Konstrukte hergestellt, die die mutierten 4xARE Elemente vor dem CYC1 Minimalpromotor und dem lacZ Reportergen trugen (Abb. 14 A). Bereits die Mutation der ersten 10bp zeigt eine deutliche Reduktion der Expression (Abb. 14 C, pYC7-4xARE-Mu1). Mutationen in den folgenden 20bp (Abb. 14 C: pYC7-4xARE-Mu2 und 3) führen zu einer nahezu vollständigen

Reduktion der Expression. Währenddessen haben die Mutationen im 4. Abschnitt (Abb. 14 C: pYC7-4xARE-Mu4) keinen Einfluß mehr auf die Expression.

Der Vergleich der transienten Expressionsstudien in Tabakblättern mit den Studien in der Hefe, zeigt einen identischen Bereich im ARE, der essentiell für die Reportergenaktivierung ist (vergl. Abb. 14 C und Abb. 8, Seite 56). Es ist daher vorstellbar, dass auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Transkriptionsfaktoren vorkommen, die spezifisch an die ersten 30bp des AREs binden.

A



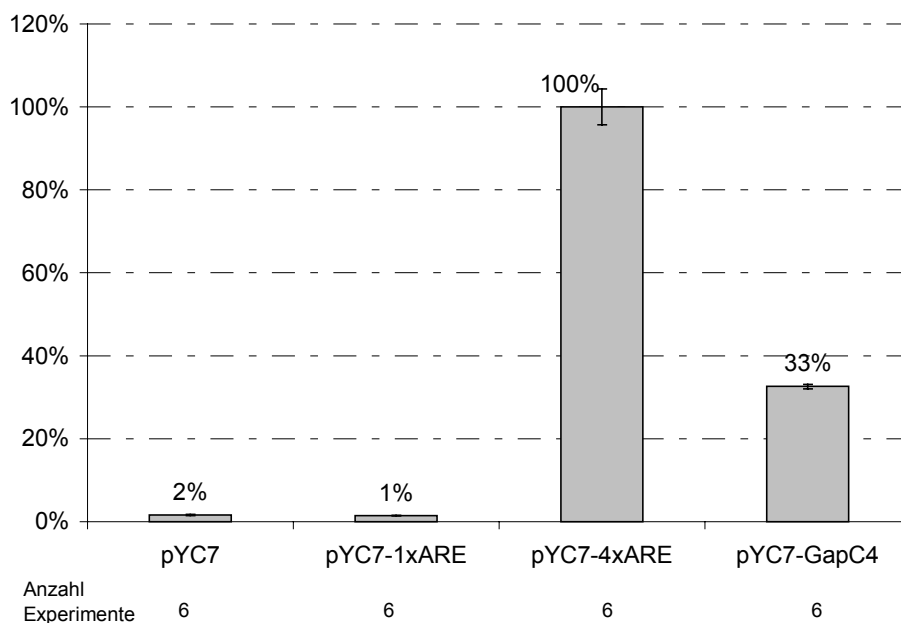
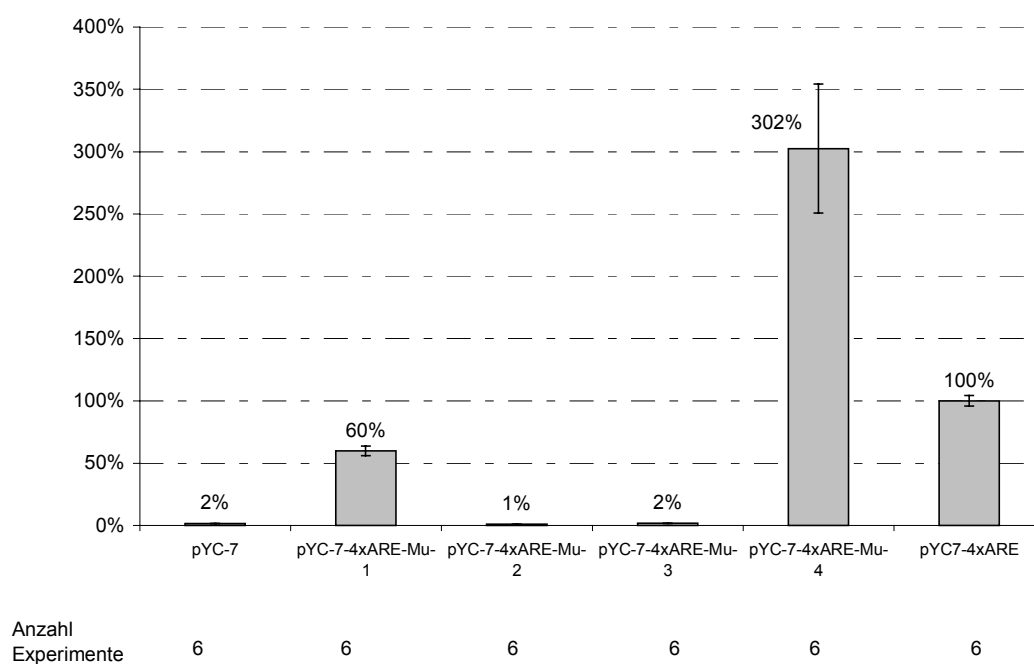
B**C**

Abb. 14: Untersuchungen des *GapC4* -Promotors und des AREs in *Saccharomyces cerevisiae* A Schematische Darstellung des ARE Tetramers, sowie der einzelnen Mutanten und dem 461bp-*GapC4* Promotor. B, C Ergebnisse der lacZ Reportergenexpression Die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente ist unter den jeweiligen Konstrukten angegeben. Die Daten sind relativ zur lacZ Expression des pYC7-4xARE Konstrukts gezeigt.

3.5.2 Isolierung von *trans* Faktoren durch den South-Western Screen

Der South-Western Screen bietet eine weitere Möglichkeit Transkriptionsfaktoren, die spezifisch an das ARE Element binden, zu klonieren. Mit diesem System sind bereits verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. WRKY- (Rushton *et al.*, 1995; Rushton *et al.*, 1996), bZIP- (Weisshaar *et al.*, 1991), Homeobox- (Korfhage *et al.*, 1994) und Myb- Proteine (Feldbrügge *et al.*, 1997) isoliert wurden. In dieser Arbeit wurde ein Arbeitsprotokoll verwendet, welches für die Isolierung mehrerer Transkriptionsfaktoren erfolgreich eingesetzt wurde (siehe 2.10, Somssich, 1996).

Eine anaerobe cDNA Bank aus Tabak (λ ZAP, Stratagene) wurde mit dem Tetramer des AREs hybridisiert. Diejenigen Klone, die den passenden Faktor exprimieren, sollten die Sonde binden können und ein Signal auf dem Röntgenfilm zeigen. Unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen konnten aus $0,5 \times 10^6$ unabhängigen Klonen 12 isoliert werden, die allerdings nur sehr schwache Signale zeigten. Eine Reproduktion dieser Signale war nicht möglich, sodass letztendlich keine Faktoren isoliert werden konnten. Möglicherweise führt eine Anpassung der Konzentration der kompetitiven Heringssperma DNA zu besseren Selektionsbedingungen, da in Abhängigkeit der Affinität des zu isolierenden Faktors zu seiner *cis* Sequenz die Konzentration der Heringssperma DNA sehr variabel ist.

4 Diskussion

Für die Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente des 461bp *GapC4* Promotors aus Mais wurden umfangreiche Deletionsanalysen vom 5'- und 3'-Ende durchgeführt. Dabei sollten Elemente identifiziert werden, die im heterologen Pflanzensystem für die anaerobe Aktivierung des Promotors wichtig sind. 17 verschiedene Deletionskonstrukte, die unterschiedliche Promotorelemente vor der *GapC4* TATA-Box und dem GUS-Reportergen tragen, wurden stabil in Tabak transformiert und die Keimlinge der Folgegeneration (R₁) auf aerobe und anaerobe Reportergenexpression untersucht.

4.1 Der *GapC4* Promotor vermittelt anaerob spezifische Genexpression, deren Stärke vergleichbar mit der des konstitutiv exprimierenden CaMV 35S Promotors ist

Transgene Tabaklinien, die das 461bp *GapC4* Promotorfragment tragen, sowie einige weitere Deletionskonstrukte erreichen anaerobe Expressionswerte (Tabelle 1), wie sie für den CaMV 35S Promotor unter aeroben Bedingungen in transgenen Tabakpflanzen beobachtet wurden (Gatz, 1997). Dabei schwanken die Angaben in der Literatur für aerobe Expression des 35S Promotors zwischen 9000U (Durchschnittswert von 15 Pflanzen (Sanger *et al.*, 1990)) und 113.000 U (Durchschnittswert von 10 Pflanzen; Gatz, 1997), wobei ein U den Umsatz von 1pmol 4-MU in einer Minute durch 1mg Protein beschreibt. Der durchschnittliche Substratumsatz von 8 transgenen Tabaklinien, die das 461bp *GapC4* Promotorelement tragen, betrug 25580 U. Diese Zahlen belegen, dass der *GapC4* Promotor unter anaeroben Bedingungen vergleichbare Expressionswerte wie der CaMV 35S Promotor erbringt. Interessanterweise wird in keinen der 133 untersuchten transgenen Linien aerobe Expression beobachtet, welches die besondere Eigenschaft des *GapC4* Promotors hinsichtlich seiner anaeroben Spezifität unterstreicht.

4.2 Organspezifische *cis*-Elemente werden im *GapC4* Promotor im heterologen Pflanzensystem Tabak nicht erkannt

Im Mais ist der *GapC4* Promotor hauptsächlich in den Wurzeln aktiv (Manjunath und Sachs, 1997). In transgenen Tabakkeimlingen ist die *GapC4* vermittelte Reportergenaktivität

dagegen in allen Organen zu beobachten. Durch keines der 17 Deletionskonstrukte des *GapC4* Promotors konnte eine gewebespezifische Änderung des Expressionsmusters im Tabak herbeigeführt werden (Abb. 4). Die Eigenschaft der organspezifischen Regulation, wie sie beim Mais beobachtet wurde, ist in der genetisch heterologen Umgebung des Tabaks für den 461bp *GapC4* Promotor verloren gegangen.

In heterologen Systemen kann die Bedeutung regulatorischer Elemente, die die Expression in bestimmten Organen oder Geweben vermitteln, verändert sein. Im Mais wird der *Adh1* Promotor anaerob induziert und wurzelspezifisch exprimiert. Im transgenen Reis dagegen wird das GUS-Gen unter der Kontrolle des *Adh1* Promotors konstitutiv in der Kalyptra, in den Antheren und deren Filamenten, im Scutellum, im Pollen, im Endosperm und im embryonalen Sproß- und Wurzelmeristem exprimiert. In den Wurzeln wurde Expression nur nach anaerober Induktion beobachtet (Kyojuka *et al.*, 1991). Die Veränderung des Expressionsmusters ließ sich auf *cis*-regulatorische Elemente innerhalb des AREs des *Adh1* Promotors zurückführen, sowie auf Elemente 5' und 3' des AREs, die im Mais keine Bedeutung für gewebespezifische Expression besitzen. (Kyojuka *et al.*, 1994).

4.3 Innerhalb des anaerob sensitiven Bereiches spielt ein 50bp Element eine besondere Rolle

Aufgrund der Deletionen des *GapC4* Promotors vom 5'- und 3'-Ende konnte ein für die anaerobe Expression wichtiger 190 bp Bereich zwischen -386 und -196 definiert werden (ASB, Abb. 2A und B). Im Mais wurde in zwei unabhängigen Studien ein Bereich von -290 bis -157 (Manjunath und Sachs, 1997) bzw. -447 bis -177 (Köhler *et al.*, 1995) lokalisiert, der für die anaerobe Expression in Maissuspensionszellen essentiell ist. Allerdings sind diese Bereiche nicht genauer untersucht wurden, sodass die Lokalisation potentieller *cis*-Elemente für Mais noch aussteht.

Im Vergleich zum 461bp Promotor vermittelt der ASB in transient transformierten Tabakblättern 56% der möglichen anaeroben Genexpression (Abb. 6). Daher ist für den ASB im Tabak nicht auszuschließen, dass Elemente aus flankierenden Bereichen noch zusätzlich zur anaeroben Expression beitragen. Hinweise darauf sind die Abnahme der anaeroben Expression nach der Deletion des Bereichs von -447 bis -386 und die immer noch leichte Reportergenexpression im Bereich zwischen -196 und -136 (vergl. Abb. 3 A und B, 5'-461 und 5'-190).

Innerhalb des ASB ist die Deletion einer 20bp Sequenz (cARE, -286 bis -266) für die

anaerobe Expression besonders bedeutsam. Sowohl 5'- als auch 3'-Deletionen zeigen nach der Deletion des cAREs die stärkste Reduktion anaerober Genexpression in allen Organen (vergl. 5'-300 und 5'-280 sowie 3'-300 und 3'-280: Tabelle 1, Abb. 3 A, B und Abb. 4).

Transgene Tabakpflanzen mit einem Minimalpromotor bestehend aus einem 50bp *GapC4* Promotorbereich (ARE, -299 bis -249), in dem das cARE zentral vorliegt, zeigen nur in direkter Orientierung anaerob spezifische Genexpression in allen Organen (Tabelle 3, Abb. 5 B). Gemessen an der Stärke anaerober Genexpression des 461bp *GapC4* Promotors wird durch das ARE nur 1,5% erreicht. In transient transformierten Tabakblättern erreicht die ARE vermittelte anaerobe Genexpression im Vergleich zum 461bp Promotor 26% (Abb. 6 B). Möglicherweise führen in den transgenen Pflanzen Positionseffekte zu einer insgesamt geringeren anaeroben Genexpression im Vergleich zum transienten System.

Transiente Expressionsstudien mit dem *Adh1* ARE Fragment aus Mais vor der 35S TATA-Box zeigten anaerobe Expressionswerte von ca. 30% relativ zur anaeroben Expression des *Adh1* Wildtyppromotors (Walker *et al.*, 1987). Olive *et al.* (1990) konnte eine *Adh1* ARE vermittelte orientierungsunabhängige Reportergenexpression zeigen. Allerdings wurde in reverser Orientierung relativ zur TATA Box eine leichte Abnahme der Expressionsstärke, wie auch aerobe Reportergenexpression beobachtet.

In transgenen Tabaklinien, die das revers zur TATA Box orientierte *GapC4* ARE trugen, konnte kein Einfluß auf aerobe Reportergenexpression festgestellt werden. Unter anaeroben Bedingungen lag die Expression im Bereich aerober Werte (Tabelle 3).

Vergleicht man die anaerobe Expressionsminderung durch die Deletion des *GapC4* AREs (~3500 U, Tabelle 1: vergl. 5'300 mit 5'280 bzw. 3'280 mit 3'300) mit der anaeroben Expression, die durch das ARE Element allein induziert wurde (Tabelle 3: 361 U), wird deutlich, dass eine vollständig anaerob induzierte Expression weitere Elemente benötigt. Die starke Reduktion anaerober Expression nach der Deletion des AREs (Abb. 3) und die nur schwache Induktion durch das ARE allein, lassen vermuten, dass sich die Kombination bestehend aus dem ARE und weiteren Elementen synergistisch auf die anaerobe Genexpression auswirken könnte.

4.4 Typische Motive anaerob-spezifischer Promotoren liegen in funktionellen Bereichen des *GapC4* AREs

Im ARE befinden sich 3 typische Motive, wie sie auch in anderen anaerob spezifischen Promotoren häufig auftreten: P-Myb Erkennungsmotiv (Hoeren *et al.*, 1998: AAACCA, -284

bis -277), GT-Box Motiv (Paul und Ferl, 1991: GGTTT, -266 bis -262) und ein 8mer Motiv ACGGTCCA (-275 bis -272; gemeinsamer *in vivo* Footprint der *Adh1* und *Adh2* Promotoren aus Mais (Paul und Ferl, 1991).

P-Myb Erkennungsmotiv (AAACCA-Motiv)

Mutationen im P-Myb Erkennungsmotiv reduzieren die anaerobe Expression im Vergleich zur Wildtypsequenz um etwa die Hälfte (Abb. 8 B, 4xARE-Mu2), wobei die anaerobe Induktion 3-fach über den aeroben Werten liegt. Für den *GapC4* Promotor ist dieses Motiv in Bezug auf die anaerobe Genexpression daher nicht essentiell. Allerdings verstärkt dieses regulatorische Element die anaerobe Genexpression und ist daher funktionell interessant.

Homologien in verschiedenen Orientierungen dieses Motivs finden sich in vielen anaeroben Promotoren mono- und dikotyledoner Pflanzen (Martin *et al.*, 1993; Dennis *et al.*, 1985; Millar und Dennis, 1996; Hossain *et al.*, 1996; Trick *et al.*, 1988; Xie und Wu, 1989). Im *Adh1* Promotor von *Arabidopsis* liegt dieses Motiv in einem funktionell wichtigem Bereich für die anaerobe Genexpression. Mutationen im AAACCA Motiv reduzieren die anaerobe Expression auf 7,1% (Dolferus *et al.*, 1994).

Hoeren *et al.* (1998) konnte die spezifische Bindung des AtMYB2 Faktors (Urao *et al.*, 1996) an das AAACCA Motiv im *Adh* Promotor von *Arabidopsis* zeigen. AtMYB2, genauso wie P-MYB Faktoren aus Mais, erkennen die Konsensussequenz ([C/T]AACGG. Wird das Kernelement AAC mutiert, bindet der AtMYB2 Faktor nicht mehr an diese Sequenz. AtMYB2 wird in *Arabidopsis* wurzelspezifisch exprimiert und hypoxisch induziert. Konstitutive Expression von AtMYB2 in verschiedenen pflanzlichen Systemen (*Arabidopsis*, Tabak, Erbse) aktiviert spezifisch die *Adh*-GUS-Reportergenexpression (Hoeren *et al.*, 1998).

GT-Box Motiv

Obwohl die GT-Box die komplementär reverse Sequenz zum P-Myb Erkennungsmotiv ist, haben Mutationen in der GT-Box (GGTTT, -266 bis -262) keinen Einfluß auf die anaerobe Expression in transient transformierten Tabakblättern. Die anaeroben Expressionsdaten sind vergleichbar mit denen des ARE-Wildtyps (vergl. Abb. 8 B, 4xARE mit 4xARE-Mu4).

Funktionell bedeutsam sind GT-Boxen jedoch in den Promotoren der *Adh* Gene aus *Arabidopsis* (reverse GT-Box bzw. P-Myb Motiv) und Mais, in denen sie unmittelbar neben GC-Boxen vorkommen und Bestandteile des AREs sind (Walker *et al.*, 1987, Dolferus *et al.*, 1994). Mutationen in der GT-Box verhindern die anaerobe Expression in *Arabidopsis*

(Dolferus *et al.*, 1994). Der *Adh1* Promotor aus Mais hat zwei GT-Boxen innerhalb des AREs. Mutationen in der ersten GT-Box reduzieren die Promotoraktivität um 75%, Mutationen in der zweiten GT-Box hingegen verhindern anaerob spezifische Genexpression (Walker *et al.*, 1987). In beiden Promotoren sind GT-Boxen den GC-Boxen eng benachbart. Mutationen in der GC-Box zeigten, dass sie für die anaerobe Genexpression ebenfalls essentiell sind (Dolferus *et al.*, 1994, Olive *et al.*, 1991).

In vivo Footprint Experimente zeigten konstitutiv geschützte Bereiche sowohl über der GT-Box als auch der GC-Box im *Adh1* Promotor aus Mais (B1 und B2, Paul und Ferl, 1991). Außerdem konnte die Bindung eines Kernfaktors aus Maissuspensionszellen im Bereich des B2-Footprints (GT-Box) gezeigt werden. Allerdings unterbinden Mutationen im B2 Bereich nicht völlig die Faktorbindung (ARF-B2; Ferl, 1990). Des weiteren wurde für beide GC-Boxen, die benachbart zum GT-Motiv liegen, die Bindung eines Kernfaktors (GCBP-1) nachgewiesen, der konstitutiv diese Elemente bindet. Mutationen des *Adh1* Promotors innerhalb der GC-Motive verhindert sowohl die Faktorbindung als auch die anaerobe Expression (Olive *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu ist im *Adh* Promotor aus *Arabidopsis* die GT-Box nicht geschützt, obwohl sie funktionell bedeutsam ist, wohl aber das benachbarte GC-Motiv (Ferl und Laughner, 1989). Eventuell beeinflusst das GT-Box Element die Bindung von Transkriptionsfaktoren an das GC-Motiv.

Obwohl im *GapC4* Promotor mehrere GC-Motive vorkommen, so scheinen sie in Bezug auf die Bedeutung der GT-Box im *GapC4* ARE keinen direkten Einfluß auf die anaerobe Expression im Tabak zu haben. Entscheidend für die Bedeutung einer GT-Box könnte das Vorkommen von GC-Motiven in ihrer unmittelbaren Umgebung sein. Möglicherweise ist daher die 5' gelegene reverse GT-Box (AAACCA-Motiv, -284 bis -277) funktionell bedeutsamer, da sie dichter an einem GC-Motiv (GTGGCCCG, -285 bis -292) liegt als die weiter 3' gelegene direkte GT-Box (-266 bis -262).

ACGGTCCA-Motiv

Mutationen im *GapC4* Promotor im Bereich -279 bis -270, verhindern anaerobe Genexpression in transient transformierten Tabakblättern. Die anaerobe Promotoraktivität läßt sich nicht mehr von der aeroben unterscheiden (Abb. 8 B, 4xARE-Mu3). Innerhalb dieses Bereichs liegt ein 8mer Motiv, welches homolog zu einem Sequenzmuster ist, das in den coregulierten Genen *Adh1* und *Adh2* aus Mais durch einen *in vivo* Footprint geschützt wird. *Adh1* und *Adh2* zeigen ein ähnliches, anaerob induzierbares, wurzelspezifisches

Expressionsmuster, welches die Vermutung zuläßt, dass ähnliche Promotormodule für ihre Regulation gebraucht werden. Allerdings wurde auch durch die *in vivo* Footprint Experimente gezeigt, dass die geschützten Bereiche beider Promotoren mit Ausnahme des 8mer sehr unterschiedlich sind. Interessanterweise liegt das 8mer sogar außerhalb des funktionell essentiellen Bereichs für die anaerobe Genexpression im *Adh1* Promotor, bindet allerdings unter Hypoxia und trägt quantitativ zur anaerob spezifischen Genexpression bei. Im *Adh2* Promotor ist dieser Footprint konstitutiv (Paul und Ferl, 1991).

Das konservierte 8mer Motiv könnte eine Zielsequenz für einen Transkriptionsfaktor sein, der am Ende eines anaerob spezifischen Signaltransduktionsweges steht. Möglicherweise werden die Bindungseigenschaften dieses Transkriptionsfaktors und ebenso der Einfluß auf die anaerob spezifische Expression durch den Kontext der Promotorumgebung unterschiedlich beeinflußt.

4.5 Der essentielle Bereich für die anaerobe Genexpression durch das GapC4 ARE enthält eine c-Myb Konsensussequenz

Datenbankvergleiche, in der das *GapC4* ARE (-299 bis -249) nach weiteren bekannten *cis*-regulatorischen Elementen durchsucht wurde, zeigten für den Bereich -279 bis -270 Homologien zu einer c-Myb Konsensussequenz ([T/C]AACNG, TRANSFAC Wingender *et al.*, 2000; <http://transfac.gbf.de/>; ; MatInspector: Quandt *et al.*, 1995). Neben einer Reihe tierischer Myb-Transkriptionsfaktoren, wird diese Konsensussequenz auch von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren erkannt. GAMYB, ein transkriptioneller Aktivator keimungs-spezifischer Gene in der Gerste (Gubler *et al.*, 1995), sowie MYBPH3, ein transkriptioneller Aktivator von Genen der Flavonoidbiosynthese (Solano *et al.*, 1997), erkennen ebenfalls das c-Myb Konsensusmotiv. Im Tabak wurde die Bindung eines Myb Faktors an die c-Myb Konsensussequenz im Promotor des *Pr1* Gens (Pathogenese verwandte Gene) und die Aktivierung des *Pr1* Gens nachgewiesen (Yang und Klessig, 1996). Die Expression dieses Myb Faktors wird durch Salicylsäure (SA) induziert. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse erster biotechnologischer Einsätze des *GapC4* Promotors in der Kartoffel zur Abwehr des Pathogens *Erwinia carotovora* interessant (Bülow *et al.*, 1999). In der Kartoffelknolle wird der *GapC4* Promotor nicht nur durch Anaerobiose, sondern auch durch Infektion mit dem Phytopathogen *Erwinia carotovora* induziert. Vermutlich geschieht dieses durch einen „mobilen Faktor“, der freigesetzt wird, wenn die Zellwände in der Kartoffelknolle durch pectolytische Enzyme abgebaut werden. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang

zwischen dem SA induzierten Myb Faktor aus Tabak und der pectolytischen Induktion des *GapC4*-Promotors in der Kartoffelknolle.

Vor dem Hintergrund eines abnehmenden Redoxpotentials bei fortschreitenden Anaerobiose, ist es interessant, dass bei einigen Myb Faktoren die Bindungsaffinität durch das Redoxpotential beeinflusst wird. In P-Myb aus Mais und tierischen c-Myb Faktoren dient das Cystein an Position 53 (P-Myb) bzw. 130 (c-Myb) als Redoxsensor (Myrset *et al.*, 1993; Williams und Grotewold, 1997). Oxidation an dieser Stelle reduziert die Bindungsaffinität der Faktoren zur Ziel-DNA. Ob Myb Faktoren allerdings tatsächlich an der anaeroben Induktion des *GapC4* Promotors mitwirken, ist zur Zeit unklar.

4.6 Kernfaktoren binden an Bereiche mit anaerob spezifischen Motiven innerhalb des AREs

Allein aufgrund von Homologien auf die Bedeutung einer *cis* Sequenz zu schließen, ist schwierig ohne Evidenzen für eine potentielle Faktorbindung zu haben. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass an das 50bp ARE Fragment Kernfaktoren binden. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Komplexe beobachtet. Der C1 Komplex wandert schnell im Polyacrylamid Gel und seine beteiligten Faktoren sind sowohl im aeroben, als auch anaeroben Kernextrakt vorhanden. Zusätzlich befinden sich im anaeroben Kernextrakt Faktoren, die einen größeren Komplex mit dem ARE bilden, den C2 Komplex (vergleiche Abb. 9 a und b).

Umfangreiche Mutationsanalysen im ARE-Element führten für den C2 Komplex zu keiner näheren Identifizierung einer Erkennungssequenz als das ARE selbst (Abb. 10, Abb. 11A). Generell führte die Mutation eines beliebigen Bereiches zur Auflösung des C2-Komplexes. Möglicherweise sind es kooperative Bindungseigenschaften, die im Zusammenhang mit den oben diskutierten *cis*-regulatorischen Elementen stehen und dazu führen, dass der C2 Komplex sich an mutierter ARE Sequenz nicht manifestieren kann. Beispiele kooperativer Transkriptionsfaktorbindung sind in der Literatur dokumentiert (Yunes *et al.*, 1998). Aufgrund der anaerob spezifischen Bindung unter Beteiligung essentieller Sequenzen für die anaerobe Genexpression, ist es sehr wahrscheinlich, dass der C2 Komplex notwendig für die spezifische Regulation des *GapC4* Promotors, zumindest aber für das ARE ist.

Für den C1 Komplex ließ sich die Erkennungssequenz durch Mutationen entlang des AREs gut identifizieren (GTGGGCCCCG, vergleiche Abb. 11 A-C). Diese Sequenz enthält interessante anaerob spezifische Motive. Neben der im Rahmen der GT-Box bereits diskutierten GC-Box in den anaerob spezifischen Elementen der *Adh* Promotoren aus

Arabidopsis und Mais, enthält die Sequenz zusätzlich noch eine „halbe G-Box“ (GTGG). Im Mais *Adh1* Promotor ist die halbe G-Box Bestandteil sowohl des hypoxisch induzierten „C Footprints“ als auch des „B1-Footprints“, der essentiell für die anaerobe Induktion des Promotors ist (Paul und Ferl, 1991). Weiter konnte gezeigt werden, dass ein aus Mais isolierter G-Box bindender Faktor (GBF1), der ebenfalls hypoxisch induziert wird, innerhalb des *Adh1* Promotors bindet. Entscheidend für die Erkennung der halben G-Box durch den GBF1 Faktor sind die flankierenden Sequenzen. Kompetitive Gel-Shift Experimente zeigten eine spezifische GBF1-DNA Interaktion mit der Sequenz tGAAACGTGGAc, aber nicht mit der Sequenz gGTCACGTGGCc (de Vetten und Ferl, 1995).

Generell führen Mutationen in der G-Box pflanzlicher Promotoren zur Reduktion induzierter Promotoraktivität (Donald und Cashmore, 1990; McKendree und Ferl, 1992; Schulze-Lefert *et al.*, 1989). Im *Adh* Promotor aus *Arabidopsis* liegen halbe und vollständige G-Boxen in geschützten Bereichen, wie es durch *in vivo* Footprint Experimente gezeigt werden konnte (Ferl und Laughner, 1989). Allerdings zeigen Mutationen innerhalb dieser G-Boxen keine signifikante Auswirkung auf die anaerobe Genexpression. Neben Anaerobiose wird dieser Promotor auch noch durch Kälte- und Dehydrationsstress induziert, welches durch Mutationen in der G-Box negativ beeinflusst wird (Dolferus *et al.*, 1994).

Inwieweit halbe oder vollständige G-Boxen (CCACGTGG) dennoch wichtig für die anaerobe Genexpression sind, scheint im wesentlichen vom Promotorkontext abzuhängen. Mutationen der C1 Erkennungssequenz im *GapC4* Promotor halbieren die anaerobe Genexpression im Vergleich zum Wildtypfragment (Abb. 8, 4xARE-Mu1) und bestätigen damit die funktionelle Rolle dieses Elementes im Rahmen der anaeroben Genexpression des *GapC4* Promotors. Ob dieser Einfluß allerdings auf das GC-Element, der halben G-Box oder der Kombination aus beiden zurückzuführen ist, muß noch untersucht werden.

4.7 Redundanz anaerob spezifischer Motive im *GapC4* Promotor wirkt sich synergistisch auf die Genexpression aus

Zumindest bei den 5'-Deletionen in den transgenen Tabakpflanzen deutet die progressive Abnahme der Reportergenexpression darauf hin, dass mehrere Faktoren an der anaeroben Expression beteiligt sind und in kooperativer Weise an den Promotor binden (Abb. 3 B). Möglich ist das Zusammenwirken verschiedener oder gleicher Transkriptionsfaktoren, die dadurch einen synergistischen Effekt auf die anaerobe Expression ausüben. Zwei Motive aus dem ARE, die für die anaerobe Genexpression bedeutsam sind, treten wiederholt im *GapC4*

Promotor auf: das AAACCA Motiv (potentielle P-Myb Sequenz) und die c-Myb Konsensussequenz [T/C]AACNG. Ein redundantes Vorkommen dieser Motive kann zumindest einen additiven Effekt erzeugen, wie die Multimerisierung dieser Elemente im 4xARE Minimalpromotor vor der *GapC4* TATA-Box und dem GUS-Reportergen zeigt, wobei es zu einer 2,3-fachen Steigerung der anaeroben Genexpression im Vergleich zum einfachen ARE kommt (Abb. 6). Additive Effekte auf die Genexpression durch Multimerisierung einzelner *cis*-regulatorischer Elemente sind auch von anderen Promotoren bekannt (Stathopoulos und Cyert, 1997; Xiong *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1994; Gubler und Jacobsen, 1992; Schöffl *et al.*, 1989).

Das AAACCA-Motiv kommt viermal im *GapC4* Promotor vor (-388 bis -381, -284 bis -277, -223 bis -216, -136 bis -129), davon 3 mal im anaerob sensitiven Bereich (ASB: -386 bis -296). Im Bereich zwischen -386 und -196 korreliert die Deletion der AAACCA Motive mit der progressiven Abnahme anaerob spezifischer Genexpression (Abb. 3, Tabelle 1: 5'-400 bis 5'-210). Die Deletion des hierzu 5'-gelegenen Bereiches hat allerdings ebenso einen starken Einfluß auf die anaerobe Genexpression, obwohl kein AAACCA Motiv vorhanden ist (Abb. 3, Tabelle 1: 5'-461). Dies unterstützt die Annahme, dass das AAACCA Motiv kein essentielles Element für anaerobe Genexpression ist, sondern mit weiteren potentiellen Elementen zusammenwirkt.

Ein zweites redundantes Motiv ist die c-Myb Konsensussequenz. Die c-Myb Konsensussequenz ist insgesamt dreimal im *GapC4* Promotor vorhanden (-400 bis -395, -318 bis -313 und -277 bis -272), davon 2 mal im ASB. Die starke, progressive Abnahme der anaeroben Genexpression im Bereich zwischen -447 und -266 korreliert mit der Deletion der c-Myb Konsensussequenzen (vergl. Abb. 3 B: 5'-461, 5'-400, 5'-300, 5'-280). Außerdem könnte die Präsenz einer c-Myb Konsensussequenz die anaerobe Expression durch den Bereich von -447 und -386 erklären. Die Expressionsstärke, die durch diesen Bereich vermittelt wird, entspricht ungefähr der des einfachen ARE, welches ebenfalls die c-Myb Konsensussequenz trägt (vergl. 5'-400 in Tabelle 1 mit ARE_F-GUS in Tabelle 3). Obwohl im ARE Tetramer die Konsensussequenz viermal wiederholt wird, im *GapC4* Promotor aber nur 3 mal vorkommt, ist dies dennoch nicht ausreichend, um die vom *GapC4* Promotor vermittelte anaerobe Expression zu erreichen (Abb. 6: 60% der anaeroben Expression des 461bp *GapC4* Promotors). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass neben der räumlichen Anordnung, die Kombination anderer regulatorischer Elemente mit der c-Myb Konsensussequenz erforderlich ist, um die vollständige Expression zu erreichen. Häufig

aktivieren Myb-Transkriptionsfaktoren ihre Zielgene zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie bZIP Faktoren (Burk *et al.*, 1993) oder Myc Faktoren (Goff *et al.*, 1992). Möglicherweise sind hier G-Box bindende Faktoren (bZIP Faktoren) beteiligt, für die die Bindung im Rahmen des C1 Komplexes an das ARE diskutiert wurde.

4.8 Transkriptionsfaktoren binden an die TATA-Box, die für die anaerobe Genexpression essentiell ist

Neben der Identifizierung Anaerobiose spezifischer Elemente, wurde die Funktionalität der TATA-Box (-46 bis -39) im *GapC4* Promotor überprüft. Bisher wurde diese TATA-Box weder im Mais noch in anderen heterologen Pflanzensystemen funktionell charakterisiert. Sowohl in DNA-Protein Bindungsstudien, als auch in funktionellen, transienten Expressionsstudien wurden die Effekte einer mutierten TATA-Box innerhalb des *GapC4* Promotors unter anaeroben und aeroben Bedingungen untersucht. Mutationen in der TATA-Box schließen eine anaerob induzierte Genexpression aus. (Abb. 12 B: vergl. 3'100 TATA-Mu mit 3'100 und 5'-461). Gel-Shift-Experimente zeigen ein verändertes Komplexierungsmuster in Abhängigkeit der Sauerstoffbedingungen. Aerob bindet ein TATA-Box abhängiger Komplex (Abb. 13, T1) an das TATA-Fragment (-46 bis +14). Unter anaeroben Bedingungen wird ein weiterer, größerer TATA-Box abhängiger Komplex beobachtet (Abb. 13, T2)

Beide Studien weisen der TATA-Box eine besondere Rolle in der anaerob regulierten Genexpression zu. Da sowohl der T1 als auch der T2 Komplex die TATA-Box spezifisch erkennen, ist es wahrscheinlich, dass beide über eine sehr ähnliche, wenn nicht gleiche DNA-Bindedomäne verfügen. Daraus ergeben sich 2 Möglichkeiten für die Regulation der anaeroben Genexpression durch die TATA-Box:

Die Komplexe T1 und T2 werden koexprimiert und konkurrieren um eine gemeinsame Bindestelle an der TATA-Box. Unter aeroben Bedingungen ist die Bindung des T1 Komplexes bevorzugt, während anaerobe Bedingungen zur Bindung des T2 Komplexes führen. T1 verhindert in diesem Fall Genexpression, wogegen die Bindung von T2 Genexpression ermöglicht.

Alternativ bindet T1 unter aeroben Bedingungen an die TATA-Box in einer inaktiven Form, die unter anaeroben Bedingungen durch zusätzliche Assoziation verschiedener anaerob spezifischer Faktoren (T2 = T1 + anaerob assoziierte Faktoren) in einen aktiven Zustand überführt wird, der die Genexpression ermöglicht. Welche Faktoren an diesem Prozeß

beteiligt sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Allerdings ist für viele eukaryotische Promotoren gezeigt worden, dass das TATA-Box bindende Protein (TBP) Bestandteil eines übergeordneten Komplexes (TFIID) ist, wobei an das TBP weitere Faktoren assoziiert sind (Burley und Roeder, 1996). Diese TATA-Box assoziierten Faktoren (TAFs) können in ihrer Zusammensetzung gewebe- und zellspezifisch, vielleicht sogar streßspezifisch verändert sein (Chang und Jaehning, 1997; Brou *et al.*, 1993; Jacq *et al.*, 1994). Sie beeinflussen die Bindung der Polymerase II an den basalen Transkriptionskomplex und können direkt oder indirekt über Coaktivatoren mit stromaufwärts gebundenen Transkriptionsfaktoren interagieren (Verrijzer und Tjian, 1996). Bisher wurden TBPs aus *Arabidopsis*, Mais, Kartoffel, Tabak und Weizen isoliert (Holdsworth *et al.*, 1992; Mukumoto *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1993; Iwataki *et al.*, 1997; Washburn *et al.*, 1997). Über die Zusammensetzung der TAFs im TFIID Komplex ist in Pflanzen allerdings nur sehr wenig bekannt und ihre Rolle in Bezug auf Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren ist weitgehend unverstanden. Zumindest im Weizen wurde beobachtet, dass der TFIID Komplex TAF Proteine enthält, mit denen ein Aktivatorprotein in bisher noch nicht geklärter Weise spezifisch interagiert (Washburn *et al.*, 1997). *In vitro* Transkriptionsexperimente zeigten eine Stimulation der Transkription durch Zugabe von Aktivator und TFIID, allerdings nicht, wenn TFIID durch TBP ersetzt wurde.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal am Beispiel des *GapC4* Promotors gezeigt werden, dass anaerober Streß ebenfalls die Zusammensetzung eines TATA-Box abhängigen Komplexes verändern kann und dass diese Veränderung funktionell mit anaerober Genexpression korreliert. Die spezifische Expression durch den *GapC4* Promotor ist daher, neben der Regulation durch das ARE und der daran bindenden Transkriptionsfaktoren, auch in besonderem Maße abhängig von der Zusammensetzung der TATA-Box abhängigen Komplexe T1 und T2.

4.9 Regulatorische Elemente des *GapC4* Promotors aktivieren Reporterexpression in der Hefe

Der *GapC4* Promotor vermittelt auch im fakultativ anaeroben Ascomycet *Saccharomyces cerevisiae* Genexpression. Ebenso wie im Tabak ist allein durch das ARE des *GapC4* Promotors die Aktivierung von Reportergenen möglich. Dabei wurde durch Mutationsanalysen gezeigt, dass die gleichen Sequenzbereiche, die auch im Tabak anaerobe Genexpression vermitteln, wirksam sind. (Abb. 14). Allerdings können leichte Unterschiede im Einfluß dieser einzelnen Elemente auf die Reporterexpression in der Hefe beobachtet

werden. Mutationen, die das Element GTGGGCCC betreffen (halbe G-Box, GC-Element), reduzieren ähnlich wie im Tabaksystem die Genexpression um ca. die Hälfte relativ zum ARE Wildtyp. Allerdings, im Gegensatz zum Tabak, ist sowohl das AAACCA Motiv (potentielle P-Myb Sequenz) als auch die c-Myb Konsensussequenz essentiell für die Genexpression in der Hefe. Mutationen in der GT-Box verdreifachen die Reportergenexpression im Vergleich zum nicht mutierten ARE, während im Tabak die Mutation in der GT-Box keinen Einfluß auf die anaerobe Expression hat.

Für G-Box Elemente wurde gezeigt, das sie Kernfaktoren der Hefe binden, die sich in Methylierungs-Interferenz Untersuchungen nicht von den pflanzlichen Kernfaktoren unterscheiden lassen und Reportergenexpression vermitteln (Donald *et al.*, 1990). Ein Vergleich der ARE Sequenz mit Hefe spezifischen Erkennungssequenzen aus der TRANSFAC Datenbank (TRANSFAC: Wingender *et al.*, 2000; PatSearch: Wingender *et al.*; 1997); zeigt in den Bereichen des AAACCA Motivs und der c-Myb Konsensussequenz Homologien: Die Erkennungssequenz CGCGAAA bzw. CACGAAA stimmt bis auf ein Nukleotid genau mit der ARE Sequenz CCCGAAA (-285 bis -279 im *GapC4* Promotor) überein. Diese Sequenz wird durch den Transkriptionsfaktorkomplex CCBF (besteht aus den Faktoren SWI4 und SWI6) erkannt und wurde in Zellzyklus-spezifischen Genen der Hefe gefunden (Nasmyth und Dirick, 1991; Andrews und Moore, 1992). Eine weitere Erkennungssequenz, die bis auf zwei Nukleotide homolog zur CCCGAAACC ARE Sequenz ist (-285 bis -277) und bis auf ein Nukleotid das AAACCA-Motiv enthält, wird von dem Transkriptionsfaktor STE12 erkannt (ATGAAACC). STE12 ist an der Pheromon-abhängigen Differenzierung des Paarungstyps α beteiligt (Dolan *et al.*, 1989).

Homologien zu einem Bereich in der c-Myb Konsensussequenz wurden in der Promotorregion der Pyruvat Kinase aus Hefe gefunden. Hier bindet der Transkriptionsfaktor ABF1 (Autonomous Replication Sequence Binding Factor 1) an die Sequenz ATCTCTCGCAACG (Chambers *et al.*, 1990), wobei der 3'gelegene Bereich (unterstrichen) mit der ARE Sequenz GCAACG (-278 bis -284 im *GapC4* Promotor) übereinstimmt. Allerdings zeigt der Vergleich mit weiteren ABF1 Erkennungssequenzen, das besonders konservierte Regionen sich nicht mit der c-Myb Sequenz homologisieren lassen (Della Seta *et al.*, 1990).

Obwohl einige Transkriptionsfaktoren der Hefe Sequenzen erkennen, die den funktionellen Bereichen der ARE Sequenz sehr ähnlich sind, bleibt es fraglich, ob sie auch im Kontext der ARE Sequenzumgebung *in vivo* an diese Motive binden. Die Ergebnisse aus den

Mutationsanalysen der ARE Sequenz in der Hefe deuten eher darauf hin, dass ein potentieller Transkriptionsfaktor entweder eine überlappende Sequenz zwischen den Sequenzabschnitten mit dem AAACCA-Motiv und der c-Myb Konsensussequenz erkennt oder die Bindung eines Transkriptionsfaktors an ein Element (AAACCA-Motiv) die Bindung eines zweiten Transkriptionsfaktors an ein weiteres Element (c-Myb Konsensussequenz) nach sich zieht, wobei nur die Kombination aus beiden Transkriptionsfaktoren zur Genexpression führt (kooperative Bindung). Letzteres ähnelt dem Modell, wie er für die Regulation des *GapC4* Promotors in Tabak postuliert wird. Möglicherweise liegt der Regulation anaerober Gene ein konservierter Mechanismus zu Grunde.

4.10 Modell zur anaeroben Regulierung des *GapC4* Promotors

In Abb. 15 A wird ein Modell zur Regulierung des *GapC4* Promotors bzw. des AREs unter anaeroben Bedingungen gezeigt. Dabei könnte, wie durch die Mutationsanalysen gezeigt wurde, die c-Myb Konsensussequenz eine wesentliche Rolle, für die Bindung der anaerob spezifischen Kernfaktoren (C2) spielen. Die flankierenden Bereiche (unter anderem das AAACCA Motiv) könnten die Bindungsaffinität an die c-Myb Konsensussequenz beeinflussen, da Mutationen in diesen Bereichen die anaerobe Genexpression zwar nicht verhindern, wohl aber negativ beeinflussen. In *in vitro* Bindungsstudien führen Mutationen in flankierenden Bereichen zum generellen Verlust einer Bindung der C2 Kernfaktoren an das ARE Fragment. In diesem Zusammenhang könnten Transkriptionsfaktoren des C1 Komplexes die Bindung der C2 Kernfaktoren an die c-Myb Konsensussequenz positiv beeinflussen, wie durch die funktionellen Mutationsanalysen und die Proteinbindungsexperimente gezeigt werden konnte.

Wenngleich auch am ARE Tetramer kein synergistischer Effekt beobachtet werden konnte, der auf eine kooperative Bindung von Kernfaktoren zurückzuführen wäre (Abb. 15 A), so ist ein solcher Effekt doch bei den Deletionsanalysen am *GapC4* Promotor zu beobachten. Möglicherweise beeinflusst ein einmal gebundener C1/C2 Komplex die weitere Bildung von C1/C2 Komplexen an potentiellen weiteren c-Myb Konsensussequenzen. Für die kooperative Bindung und den Synergieeffekt könnten die Abstände zwischen den Motiven bedeutsam sein (Abb. 15 C).

Die Interaktion zwischen dem T1/T2 TATA-Box Komplex und den stromaufwärts gelegenen Transkriptionsfaktoren (C1/C2 Komplexe) könnte entweder direkt sein oder durch einen

Coaktivator vermittelt werden. Der interne Anstieg der Ca^{2+} Konzentration als eine sehr frühe Antwort auf anaerobe Bedingungen (Subbaiah *et al.*, 1994), könnte einen Coaktivator aktivieren, der anschließend die stromaufwärts gelegenen Transkriptionsfaktoren mit dem TATA Box Komplex verbindet. In Mais, *Arabidopsis* und Reis sind GF14 Proteine identifiziert wurden, die mit dem G-Box bindenden Transkriptionsfaktor GBF assoziiert sind (de Vetten *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1994a, Schultz *et al.*, 1998). GF14 omega aus *Arabidopsis* (Lu *et al.*, 1994b) hat die Eigenschaft Ca^{2+} zu binden und als Aktivator Genexpression zu induzieren (Wang *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass GF14 an TBP, sowie an spezifische TAFs und einen weiteren generellen Transkriptionsfaktor, TFIIB, bindet (Pan *et al.*, 1999).

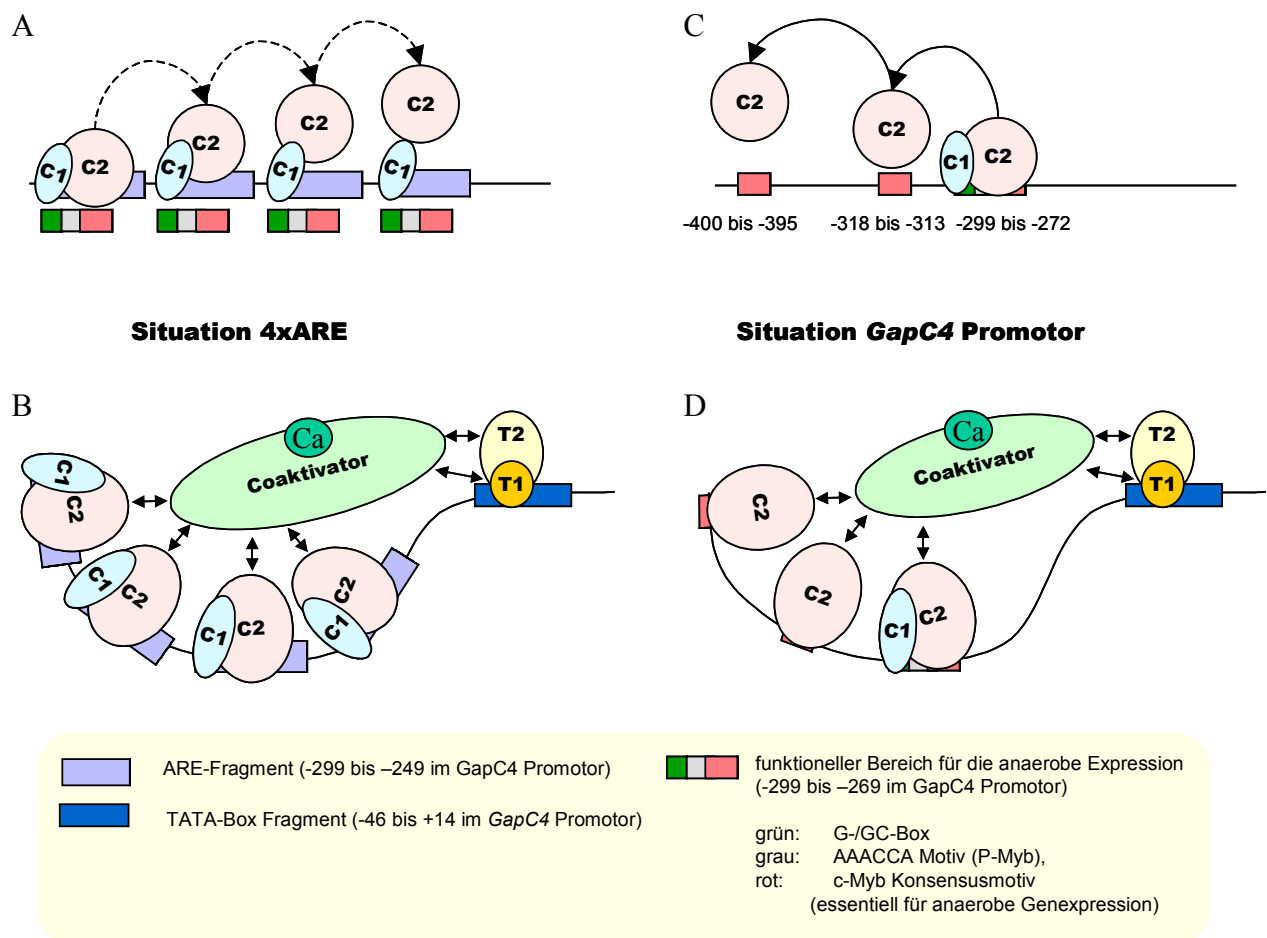


Abb. 15: Modell anaerober Regulation durch das ARE Tetramer und den GapC4 Promotor: A additiver Effekt durch beschränkt mögliche kooperative Bindung (---) C synergistischer Effekt durch kooperative Bindung des C2 Komplexes (—). B, D Postulierte Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren unter anaeroben Bedingungen. Eine genauere Beschreibung wird im Text gegeben.

GF14 Proteine zeigen eine hohe Homologie zu der Familie der 14-3-3 Proteine . Bisher nur

bei Pflanzen beobachtet ist das Erscheinen im Zellkern (Bihn *et al.*, 1997). In Pflanzen sind 14-3-3 Proteine an vielen regulatorischen Prozessen beteiligt, bei denen Phosphorylierung eine Rolle spielt. Erst das Zusammenspiel phosphorylierter Proteine mit einem 14-3-3 Adaptermolekül vervollständigt die Umsetzung von Signalen (Chung *et al.*, 1999; MacKintosh, 1998). Beispiele hierfür sind die Regulation von H⁺-ATPasen, Nitratreduktase, Sucrose-Phosphat-Synthase (Jahn *et al.*, 1997; Douglas *et al.*, 1998; Bachmann *et al.*, 1996). Zur Zeit ist nicht klar, ob ein Ca²⁺ induzierter Coaktivator zwischen den stromaufwärts gelegenen Transkriptionsfaktoren (C1/C2 Komplex) und dem TATA Box Komplex vermittelt und ob die Anzahl der C1/C2 Komplexe die Bindung dieses Coaktivators beeinflussen, wie es in Abb. 15 B und D dargestellt wird. Die anaerobe Signaltransduktion in Pflanzen ist noch weitgehend unverstanden und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

5 Zusammenfassung

Unter Anaerobiose verändert sich der Energiemetabolismus in Anpassung an das reduzierte Sauerstoffangebot. Die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien ist nur noch eingeschränkt möglich, wobei zunehmend anfallende Reduktionsäquivalente, die bei der Glykolyse gebildet werden, durch die einsetzende Fermentation reoxidiert werden müssen und damit dem Stillstand der Glykolyse entgegenwirken. Während dieser Adaption wird die Transkription vieler Gene eingestellt und nur noch eine spezifische Auswahl an Genen exprimiert bzw. translatiert. Hauptsächlich sind dies Gene der Glykolyse. Das *Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase 4* Gen (*GapC4*) aus Mais wird anaerob induziert und gehört zu einer Genfamilie cytosolischer *Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenasen*, die aus drei weiteren Mitgliedern besteht: *GapC1*, *GapC2*, *GapC3*. Der 461bp Promotor des *GapC4*-Gens wird sowohl im Mais als auch im transgenen Tabak anaerob induziert. In dieser Arbeit wurde der 461bp Promotor des *GapC4* Gens hinsichtlich seiner anaerob spezifischen Elemente im heterologen Tabaksystem untersucht.

Die Analyse von 133 unterschiedlichen, transgenen Tabaklinien mit Deletionen vom 5'- und 3'-Ende des *GapC4* Promotors führte zur Identifizierung eines anaerob sensitiven Bereiches (ASB) von 190bp zwischen -386 und -196. Regulatorische Elemente, die organspezifische Expression vermitteln, konnten anhand der Deletionsanalysen für Tabak nicht nachgewiesen werden. Innerhalb des ASB liegt ein 20bp Fragment (cARE: -286 bis -266) mit besonders starkem Einfluß auf die anaerobe Genexpression im transgenen Tabak.

17 transgene Tabaklinien, die ein Minimalpromotor bestehend aus einem 50bp *GapC4* Fragment (-299 bis -249) mit zentralem cARE vor der *GapC4* TATA-Box in unterschiedlichen Orientierungen tragen, vermitteln schwache anaerob induzierte, orientierungsabhängige Reportergenexpression. Im Vergleich zum 461bp *GapC4* Promotor beträgt die durchschnittliche Expressionsstärke nur 1,5%. Innerhalb des AREs befinden sich typische Motive anaerob spezifischer Promotoren: ein kombiniertes Element aus GC-Box und halber G-Box (-293 bis -285), ein AAACCA-Motiv (-284 bis -274) bzw. die dazu reverse GT-Box (-266 bis -262) und ein ACGGTCCA-Motiv (gemeinsamer Footprint der *Adh1* und *Adh2* Promotoren aus Mais; -275 bis -272). Außerdem befindet sich eine c-Myb Konsensussequenz im ARE, welche zum Teil das ACGGTCCA-Motiv überlappt

([T/C]AACNG; -279 bis 270).

In transienten Expressionsstudien mit mutierten AREs wurde gezeigt, dass außer der GT-Box alle weiteren Motive in einem funktionellen Zusammenhang mit der anaerob induzierten Genexpression des AREs stehen. Mutationen im kombinierten GC/G-Box Element und im AAACCA-Motiv beeinflussen nur die Expressionsstärke. Mutationen im ACGGTCCA-Motiv bzw. in der c-Myb Konsensussequenz verhindern anaerobe Genexpression.

Analoge Untersuchungen an dem fakultativen Anaerobier *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass sowohl der *GapC4* Promotor als auch das ARE in diesem heterologen System Genexpression vermittelt. Durch Mutationen des AREs wurde belegt, dass die Genexpression von den gleichen Sequenzabschnitten abhängt, wie sie auch für die anaerobe Genexpression im Tabak notwendig sind.

Neben dem AAACCA Element kommt die für die anaerobe Expression essentielle c-Myb Konsensussequenz mehrfach im 461bp *GapC4* Promotor vor. In transgenen Tabakpflanzen konnte anhand der Deletionsanalysen vom 5'-Ende gezeigt werden, dass die Abnahme der anaeroben Genexpression eindeutig mit der Deletion des c-Myb Konsensusmotivs korreliert. Transiente Expressionsstudien belegen, dass die Multimerisierung dieses Motivs im Tetramer des AREs einen additiven Effekt auf die anaerobe Genexpression hat. Im Vergleich zum ARE Monomer ist die anaerobe Genexpression des ARE Tetramers 2,3-fach höher und erreicht 60% der anaeroben Genexpression des 461bp *GapC4* Promotors.

DNA-Proteinbindungsstudien mit dem ARE und Kernproteinextrakten aus aerob und anaerob induzierten Tabakblättern zeigten zwei unterschiedlich Komplexe, die spezifisch an das ARE binden. Der konstitutiv an das ARE bindende C1 Komplex erkennt spezifisch ein GTGGGCCCCG Motiv am 5'-Ende des AREs. Der C2 Komplex bindet anaerob spezifisch an das ARE und benötigt für die Bindung das gesamte ARE Fragment.

Untersuchungen mit der mutierten TATA-Box des *GapC4* Promotors in transient transformierten Tabakblättern haben gezeigt, dass die TATA-Box essentiell für die anaerob spezifische Induktion des *GapC4* Promotors ist. Mutationen in der TATA-Box verhindern anaerobe Genexpression.

DNA-Proteinbindungsstudien mit aeroben und anaerob induzierten Kernproteinextrakten und einem 60bp *GapC4*-Fragment, das die TATA-Box enthält, zeigten 3 unterschiedliche Komplexe, die spezifisch binden. Der konstitutiv bindende T1 Komplex erkennt spezifisch das TATA-Box Motiv. Zwei weitere Komplexe werden anaerob induziert, wobei T2 ebenfalls spezifisch das TATA-Box Motiv bindet. T3 besitzt keine spezifische Bindungsaffinität zur TATA-Box. T1 und T2 sind sehr wahrscheinlich unterschiedliche Formen eines TATA-Box bindenden Komplexes, der unter anaeroben Bedingungen modifiziert werden kann.

Der *GapC4* Promotor zeichnet sich besonders durch seine anaerob spezifische Aktivität und Stärke gegenüber anderen Promotoren aus. Letztendlich konnten Motive in diesem Promotor bestimmt werden, deren Kombination eine wichtige Rolle für die Spezifität spielen. Die besondere Stärke, die dabei von diesem Promotor erreicht wird, läßt sich, zumindest zum Teil, mit der Redundanz bestimmten Motive korrelieren.

6 Literaturverzeichnis

- Albrecht, G. and Wiedenroth, E. M.** (1994). Protection against activated oxygen following reaeration of hypoxically pretreated wheat roots: the response of the glutathione system. *J. Exp. Bot.* **45**, 449-455.
- Aldrich, H. C., Ferl, R. J., Hils, M. H. and Akin, D. E.** (1985). Ultrastructural correlates of anaerobic stress in corn roots. *Tissue Cell* **17**, 341-8.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-402.
- Andreev, V. Y., Generozova, I. P. and Vartapetian, B. B.** (1991). Energy status and mitochondrial ultrastructure of excised pea root at anoxia and postanoxia. *Plant Physiol. Biochem.* **29**, 171-176.
- Andrews, B. J. and Moore, L. A.** (1992). Interaction of the yeast Swi4 and Swi6 cell cycle regulatory proteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24), 11852-6.
- Andrews, C. J. and Pomeroy, K.** (1989). Metabolic acclimation to hypoxia in winter cereals: Low temperatur flooding increases adenylates and survival in ice encasement. *Plant Physiol.* **91**, 1063-1068.
- Andrews, D. L., Cobb, B. G., Johnson, J. R. and Drew, M.** (1993). Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **101**, 407-414.
- Andrews, D. L., Drew, M. C., Johnson, J. R. and Cobb, B. G.** (1994a). The response of maize seedlings of different ages to hypoxic and anoxic stress. *Plant Physiol.* **105**, 53-60.

-
- Andrews, D. L., MacAlpine, D. M., Johnson, J. R., Kelley, P. M., Cobb, B. G. and Drew, M. C.** (1994b). Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiol.* **106**, 1575-82.
- Armstrong, W., Brändle, R. and Jackson, M. B.** (1994). Mechanism of flood tolerance in plants. *Acta Bot. Néerl.* **43**, 307-358.
- Bachmann, M., Huber, J. L., Athwal, G. S., Wu, K., Ferl, R. J. and Huber, S. C.** (1996). 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Lett.* **398**, 26-30.
- Bailey-Serres, J., B., K.-G. and Freeling, M.** (1988). Genetic and molecular approaches to the study of the anaerobic response and tissue specific gene expression in maize. *Plant Cell Environ.* **11**, 351-357.
- Bailey-Serres, J. and Dawe, R. K.** (1996). Both 5' and 3' sequences of maize adh1 mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* **112**, 685-95.
- Bailey-Serres, J. and Freeling, M.** (1990). Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol.* **94**, 1237-1243.
- Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K. and Lee, C. H.** (1997). Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiol.* **114**, 1293-305.
- Bertani, A., Brambilla, I. and Menegus, F.** (1980). Effect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate and fate of fermentation products. *J. Exp. Bot.* **31**, 325-331.
- Bewley, J. D. B., M.** (1994). Seeds: Physiology of Development and Germination. In *Plenum*. New York.
- Bihn, E. A., Paul, A. L., Wang, S. W., Erdos, G. W. and Ferl, R. J.** (1997). Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of arabidopsis and maize. *Plant J.* **12**, 1439-45.

-
- Botha, F. C. P., G P; Botha, A M.** (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regul.* **11**, 211-224.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7**, 248-254.
- Brou, C., Chaudhary, S., Davidson, I., Lutz, Y., Wu, J., Egly, J. M., Tora, L. and Chambon, P.** (1993). Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO* **12**, 489-99.
- Bucher, M. and Kuhlemeier, C.** (1993). Long-term anoxia tolerance. Multi-level regulation of gene expression in the amphibious plant *Acorus calamus* L. *Plant Physiol.* **103**, 441-8.
- Bülow, L., Köhler, U., Cerff, R., Hehl, R. and Düring, K.** (1999). Induction of the maize GapC4 promoter in transgenic potato under anaerobiosis and in *Erwinia carotovora* - inoculated tuber tissue. *Mol Plant-Microbe Interact.* **12**, 182-188.
- Burk, O., Mink, S., Ringwald, M. and Klempnauer, K. H.** (1993). Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors. *EMBO.* **12**, 2027-38.
- Burley, S. K. and Roeder, R. G.** (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 769-99.
- Chambers, A., Stanway, C., Tsang, J. S., Henry, Y., Kingsman, A. J. and Kingsman, S. M.** (1990). ARS binding factor 1 binds adjacent to RAP1 at the UASs of the yeast glycolytic genes PGK and PYK1. *Nucleic Acids Res* **18**(18), 5393-9.
- Carystinos, G. D., MacDonald, H. R., Monroy, A. F., Dhindsa, R. S. and Poole, R. J.** (1995). Vacuolar H(+)-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol.* **108**, 641-9.
- Chang, M. and Jaehning, J. A.** (1997). A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4861-5.

-
- Chaubet, N., Clement, B. and Gigot, C.** (1992). Genes encoding a histone H3.3-like variant in Arabidopsis contain intervening sequences. *J. Mol. Biol.* **225**, 569-74.
- Chung, H. J., Sehnke, P. C. and Ferl, R. J.** (1999). The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* **4**, 367-371.
- Clark, L. H. H., W M.** (1981). Observation of the root anatomy of rice. *Am. J. Bot.* **68**, 154-161.
- Cleland, R. E. F., T; Lucas, W J.** (1994). Plasmodesmal-mediated cell-to-cell transport in wheat roots is modulated by anaerobic stress. *Protoplasma* **178**, 81-85.
- Davies, J. M., Poole, R. J. and Sanders, D.** (1993). The computed free energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance for pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochem. Biophys. Acta* **1141**, 29-36.
- de Vetten, N. C. and Ferl, R. J.** (1995). Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J.* **7**, 589-601.
- de Vetten, N. C., Lu, G. and Feri, R. J.** (1992). A maize protein associated with the G-box binding complex has homology to brain regulatory proteins. *Plant Cell* **4**, 1295-307.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. and Subramani, S.** (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **7**, 725-37.
- DeLisle, A. J. and Ferl, R. J.** (1990). Characterization of the Arabidopsis Adh G-box binding factor. *Plant Cell* **2**, 547-558.
- Della Seta, F., Treich, I., Buhler, J. M. and Sentenac, A.** (1990). ABF1 binding sites in yeast RNA polymerase genes. *J Biol Chem* **265**(25), 15168-75.
- Dennis, E. S., Gerlach, W. L., Walker, J. C., Lavin, M. and Peacock, W. J.** (1988a). Anaerobically regulated aldolase gene of maize: A chimeric origin? *J. Mol. Biol.* **202**, 759-768.

-
- Dennis, E. S., Sachs, M. M., Gerlach, W. L., Beach, L., and Peacock, W. J.** (1988). The Ds1 transposable element acts as an intron in the mutant allele Adh1-Fm335 and is spliced from the message. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3815-28.
- Dennis, E. S., Sachs, M. M., Gerlach, W. L., Finnegan, E. J. and Peacock, W. J.** (1985). Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase 2 (Adh2) gene of maize. *Nucleic Acids Res.* **13**, 727-43.
- Dolan, J. W., Kirkman, C. and Fields, S.** (1989). The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15), 5703-7.
- Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W. J. and Dennis, E. S.** (1994). Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene. *Plant Physiol.* **105**, 1075-1087.
- Donald, R. G. and Cashmore, A. R.** (1990). Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the Arabidopsis rbcS-1A promoter. *EMBO.* **9**, 1717-26.
- Donald, R. G., Schindler, U., Batschauer, A. and Cashmore, A. R.** (1990). The plant G box promoter sequence activates transcription in *Saccharomyces cerevisiae* and is bound in vitro by a yeast activity similar to GBF, the plant G box binding factor. *EMBO.* **9**, 1727-35.
- Douglas, P., Moorhead, G., Hong, Y., Morrice, N. and MacKintosh, C.** (1998). Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea oleracea* leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase. *Planta* **206**, 435-42.
- Drew, M. C.** (1988). Effects of flooding and oxygen deficiency on plant mineral nutrition. In *Advances in Plant Nutrition*, vol. 3 (ed. A. T. Lauchli, P B), pp. 115-159. New York: Praeger.
- Drew, M. C.** (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**, 223-250.

-
- Duss, F. and Brändle, R.** (1982). Flooding tolerance in bulrush (*Schoenoplectus lacustris* L. Palla) . V. Synthesis of different fermentation products and transport substances in the rhizome tissue under oxygen deficit. *Flora* **172**, 217-222.
- Edelstein, M. C., F; Kigel, J; Nerson H.** (1995). Seed coat structure and oxygen availability control low temperature germination of melon (*Cucumis melo*) seeds. *Physiol. Plant* **93**, 451-456.
- Ellis, J. G., Llewellyn, D. J., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.** (1987). Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: Addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO* **6**, 11-16.
- Fan, T. W., Higashi, R. M. and Lane, A. N.** (1988). An in vivo ¹H and ³¹P NMR investigation of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. *Arch. Biochem. Biophys.* **266**, 592-606.
- Feldbrugge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K., and Weisshaar, B.** (1997). PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J.* **11**, 1079-93.
- Felle, H. H.** (1996). Control of cytoplasmic pH under anoxic conditions and its implication for plasma membrane proton transport in *Medicago sativa* root hairs. *J. Exp. Bot.* **47**, 967-973.
- Fennoy, S. L. and Bailey-Serres, J.** (1995). Post-transcriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* **7**, 287-295.
- Fennoy, S. L., Nong, T. and Bailey-Serres, J.** (1998). Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* **15**, 727-735.
- Ferl, R. J.** (1990). ARF-B-2: A protein complex that specifically binds to part of the anaerobic response element of maize Adh1. *Plant Physiol.* **93**, 1094-1101.
- Ferl, R. J. and Laughner, B. H.** (1989). In vivo detection of regulatory factor binding sites of *Arabidopsis thaliana* Adh. *Plant Mol. Biol.* **12**, 357-366.

-
- Fields, S., Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 245-247.
- Foster, R., Izawa, T. and Chua, N. H.** (1994). Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB* 8, 192-200.
- Fox, T. C., Kennedy, R. A., and Rumpho, M. E.** (1994). Energetics of plant growth under anoxia: Metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon*. *Ann. Bot.* 74, 445-455.
- Gatz, C.** (1997). Chemical control of gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 89-108.
- Gietz, R. D., and Schiestl, R.H.** (1995). Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 255-269.
- Goff, S. A., Cone, K. C. and Chandler, V. L.** (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev* 6, 864-75.
- Good, A. G. and Paetkau, D. H.** (1992). Identification and characterization of a hypoxically induced maize lactate dehydrogenase gene. *Plant Mol. Biol.* 19, 693-7.
- Gubler, F., and Jacobsen, J. V.** (1992). Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pI alpha-amylase gene. *Plant Cell* 4, 1435-41.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K. and Jacobsen, J. V.** (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* 7, 1879-91.
- Gudleifsson, B. E.** (1994). Metabolite accumulation during ice encasement of timothy grass (*Phleum pratense* L.). *Proc. R. Soc. Edinburgh B* 102, 373-380.
- Hoeren, F. U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W. J. and Dennis, E. S.** (1998). Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* 149, 479-90.

-
- Holdsworth, M. J., Grierson, C., Schuch, W. and Bevan, M.** (1992). DNA-binding properties of cloned TATA-binding protein from potato tubers. *Plant Mol. Biol.* **19**, 455-64.
- Honma, M. A., Baker, B. J. and Waddell, C. S.** (1993). High-frequency transposition of Ds-ALS in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6242-6246.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D.** (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol* **168**, 1291-301.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rofers, S. G. and Fraley, R. T.** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.
- Hossain, M. A., Huq, E., Grover, A., Dennis, E. S., Peacock, W. J. and Hodges, T. K.** (1996). Characterization of pyruvate decarboxylase genes from rice. *Plant Mol. Biol.* **31**, 761-70.
- Howard, E. A., Walker, J. C., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.** (1987). Regulated expression of an alcohol dehydrogenase 1 chimeric gene introduced into maize protoplasts. *Planta* **170**, 535-540.
- Ichimura, T., Uchiyama, J., Kunihiro, O., Ito, M., Horigome, T., Omata, S., Shinkai, F., Kaji, H. and Isobe, T.** (1995). Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *J. Biol. Chem* **270**, 28515-8.
- Iwataki, N., Hoya, A. and Yamazaki, K.** (1997). Restoration of TATA-dependent transcription in a heat-inactivated extract of tobacco nuclei by recombinant TATA-binding protein (TBP) from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **34**, 69-79.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P. and Tora, L.** (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* **79**, 107-17.

-
- Jahn, T., Fuglsang, A. T., Olsson, A., Bruntrup, I. M., Collinge, D. B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M. G. and Larsson, C.** (1997). The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *Plant Cell* **9**, 1805-14.
- Jefferson, R. A.** (1987). Assaying chimaric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W.** (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO*. **6**, 3901-3907.
- Johnson, C. H., Kruff, V. and Subramanian, A. R.** (1990). Identification of a plastid-specific ribosomal protein in the 30 S subunit of chloroplast ribosomes and isolation of the cDNA clone encoding its cytoplasmic precursor. *J. Biol. Chem.* **265**, 12790-5.
- Johnson, J. R., Cobb, B. G. and Drew, M. C.** (1989). Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **91**, 837-843.
- Johnson, J. R., Cobb, B. G. and Drew, M. C.** (1994). Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh1* null *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **105**, 61-67.
- Ke, D., Yahia, E., Hess, B., Zhou, L. and Kader, A. A.** (1995). regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbocn dioxide stresses. *J. Am. Soc. Hortic Sci.* **120**, 481-490.
- Kelley, P. M. and Freeling, M.** (1984a). Anaerobic expression of maize fructose-1,6-diphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **259**, 14180-3.
- Kelley, P. M. and Freeling, M.** (1984b). Anaerobic expression of maize glucose phosphate isomerase I. *J. Biol. Chem.* **259**, 673-7.
- Kennedy, R. A., Rumpho, M. E. and Fox, T. C.** (1992). Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* **100**, 1-6.
- Kersanach, R., Brinkmann, H., Liaud, M. F., Zhang, D. X., Martin, W. and Cerff, R.** (1994). Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature* **367**, 387-9.

-
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A. and Ecker, J. R.** (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-41.
- Kim, Y., Buckley, K., Costa, M. A., and An, G.** (1994). A 20 nucleotide upstream element is essential for the nopaline synthase (nos) promoter activity. *Plant Mol. Biol.* **24**, 105-17.
- Kim, S. Y., Chung, H.-W. and Thomas, T. L.** (1997). Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* **11**, 1237-1251.
- Klein, T. M., Gradziel, T., Fromm, M. E. and Sanford, J. C.** (1988). Factors influencing gene delivery into Zea mays cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Tech.* **6**, 559-563.
- Köhler, U., Liaud, M. F., Mendel, R. R., Cerff, R. and Hehl, R.** (1995). The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1293-8.
- Köhler, U., Mendel, R. R., Cerff, R. and Hehl, R.** (1996). A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco. *Plant J.* **10**, 175-183.
- Korfhage, U., Trezzini, G. F., Meier, I., Hahlbrock, K. and Somssich, I. E.** (1994). Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* **6**, 695-708.
- Kyozuka, J., Fujimoto, H., Izawa, T. and Shimamoto, K.** (1991). Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize Adh1 promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 40-8.
- Kyozuka, J., Olive, M., Peacock, W. J., Dennis, E. S. and Shimamoto, K.** (1994). Promoter elements required for developmental expression of the maize Adh1 gene in transgenic rice. *Plant Cell* **6**, 799-810.
- Laszlo, A. and St. Lawrence, P.** (1983). Parallel induction of PDC and ADH in anoxic maize roots. *Mol. Gen. Genet.* **192**, 110-117.

-
- Llewellyn, D. J., Finnegan, E. J., Ellis, J. G., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.** (1987). Structure and expression of an alcohol dehydrogenase 1 gene from *Pisum sativum* (cultivar Greenfeast). *J. Mol. Biol.* **195**, 115-124.
- Lu, G., DeLisle, A. J., de Vetten, N. C. and Ferl, R. J.** (1992). Brain proteins in plants: an Arabidopsis homolog to neurotransmitter pathway activators is part of a DNA binding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 11490-4.
- Lu, G., Rooney, M. F., Wu, K. and Ferl, R. J.** (1994a). Five cDNAs encoding Arabidopsis GF14 proteins. *Plant Physiol.* **105**, 1459-60.
- Lu, G., Sehnke, P. C. and Ferl, R. J.** (1994b). Phosphorylation and calcium binding properties of an Arabidopsis GF14 brain protein homolog. *Plant Cell* **6**, 501-510.
- Lushuk, J. A. and Saltveit, M. E.** (1991). Effects of rapid changes in oxygen concentration on respiration of carrot roots. *Physiol. Plant* **82**, 559-568.
- MacDonald, R. C. and Kimmerer, T. W.** (1993). Metabolism of transpired ethanol by eastern cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.). *Plant Physiol.* **102**, 173-179.
- MacKintosh, C.** (1998). Regulation of cytosolic enzymes in primary metabolism by reversible protein phosphorylation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 224-9.
- Manjunath, S. and Sachs, M. M.** (1997). Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. *Plant Mol. Biol.* **33**, 97-112.
- Martin, C. and Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* **13**, 67-73.
- Martin, T., Frommer, W. B., Salanoubat, M. and Willmitzer, L.** (1993). Expression of an Arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J.* **4**, 367-77.
- Martinez, P., Martin, W. and Cerff, R.** (1989). Structure, evolution and anaerobic regulation of a nuclear gene encoding cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *J. Mol. Biol.* **208**, 551-65.

-
- McCarty, D. R., Shaw, J. R. and Hannah, L. C.** (1986). The cloning, genetic mapping, and expression of the constitutive sucrose synthase locus of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**, 9099-9103.
- McKendree, W. L., Paul, A. L., Delisle, A. J. and Ferl, R. J.** (1990). In vivo and in vitro characterization of protein interactions with the dyad G-box of the Arabidopsis Adh gene. *Plant Cell* **2**, 207-214.
- McKendree, W. L. J. and Ferl, R. J.** (1992). Functional elements of the Arabidopsis Adh promoter include the G-box. *Plant Mol. Biol.* **19**, 859-862.
- Menegus, F., Cattaruzza, L., Chersi, A. and Fronza, G.** (1989). Differences in the anaerobic lactate-succinate production and changes of cell sap pH for plant with high and low resistance to anoxia. *Plant Physiol.* **90**, 29-32.
- Mertens, E., Larondelle, Y. and Hers, H.-G.** (1990). Induction of pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1 phosphotransferase by anoxia in rice seedlings. *Plant Physiol.* **93**, 584-587.
- Millar, A. A. and Dennis, E. S.** (1996). The alcohol dehydrogenase genes of cotton. *Plant Mol. Biol.* **31**, 897-904.
- Millar, A. H., Bergersen, F. J. and Day, D. A.** (1994). Oxygen affinity of terminal oxidases in soybean mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 847-852.
- Miller, J. F.** (1994). Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.* **235**, 375-85.
- Monk, L. S., Crawford, R. M. M. and Brändle, R.** (1984). Fermentation rates and ethanol accumulation in relation of flooding tolerance in rhizomes of monocotyledonous species. *J. Exp. Bot.* **35**, 738-745.
- Moorhead, G., Douglas, P., Cotellet, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A. et al.** (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J.* **18**, 1-12.

-
- Mukumoto, F., Hirose, S., Imaseki, H. and Yamazaki, K.** (1993). DNA sequence requirement of a TATA element-binding protein from *Arabidopsis* for transcription in vitro. *Plant Mol. Biol.* **23**, 995-1003.
- Myrset, A. H., Bostad, A., Jamin, N., Lirsac, P. N., Toma, F. and Gabrielsen, O. S.** (1993). DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO* **12**(12), 4625-33.
- Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R. G., and Manners, J. M.** (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS* **67**, 325-328.
- Nasmyth, K. and Dirick, L.** (1991). The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**(5), 995-1013.
- Olive, M. R., Peacock, W. J. and Dennis, E. S.** (1991). The anaerobic responsive elements contains two GC-rich sequences essential for binding a nuclear protein and hypoxic activation of the maize Adh1 promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**, 7053-7060.
- Olive, M. R., Walker, J. C., Singh, K., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.** (1990). Functional properties of the anaerobic responsive element of the maize Adh1 gene. *Plant Mol. Biol.* **15**, 593-604.
- Olszewski, N. E., Martin, F. B. and Ausubel, F. M.** (1988). Specialized binary vector for plant transformation: expression of the *Arabidopsis thaliana* AHAS gene in *Nicotiana tabacum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10765-10782.
- Pan, S., Sehne, P. C., Ferl, R. J., and Gurley, W. B.** (1999). Specific interactions with TBP and TFIIB in vitro suggest that 14-3-3 proteins may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex. *Plant Cell* **11**, 1591-602.
- Parker, C. S. and Topol, J.** (1984). A *Drosophila* polymerase II transcription factor contains a promotor region specific DNA binding activity. *Cell* **36**, 357-369.
- Paul, A. L. and Ferl, R. J.** (1991). In vivo footprinting reveals unique cis-elements and different modes of hypoxic induction in maize Adh1 and Adh2. *Plant Cell* **3**, 159-168.
- Piper, P.** (1996). Isolation of yeast DNA. *Methods Mol. Biol.* **53**, 103-7.

-
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. & Werner, T.** (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* **23**(23), 4878-84.
- Rivoal, J. and Hanson, A. D.** (1993). Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *Limonium*. *Plant Physiol.* **101**, 553-560.
- Roberts, J. K., Callis, J., Jardetzky, O., Walbot, V. and Freeling, M.** (1984a). Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **81**, 6029-33.
- Roberts, J. K., Callis, J., Wemmer, D., Walbot, V. and Jardetzky, O.** (1984b). Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **81**, 3379-83.
- Roeder, R. G.** (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 402-8.
- Roeder, R. G.** (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 327-35.
- Rowland, L. J. and Strommer, J. N.** (1986). Anaerobic treatment of maize roots affects transcription of Adh1 and transcript stability. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3368-72.
- Rushton, P. J., Macdonald, H., Huttly, A. K., Lazarus, C. M. and Hooley, R.** (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol. Biol.* **29**, 691-702.
- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K. and Somssich, I. E.** (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO* **15**, 5690-700.
- Russel, D. A., and Sachs, M.M.** (1989). Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family. *Plant Cell* **1**, 793-803.

-
- Russell, D. A., and Sachs, M. M.** (1991). The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 219-28.
- Russell, D. A. and Sachs, M. M.** (1992). Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress. *Plant Physiol.* **99**, 615-620.
- Sachs, M. M., Freeling, M., and Okimoto, R.** (1980). The anaerobic proteins of maize. *Cell* **20**, 761-767.
- Sachs, M. M., Subbaiah, C. C. and Saab, I. N.** (1996). Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J. Exp. Botany* **47**, 1-15.
- Saglio, P. H.** (1985). Effect of path or sink anoxia on sugar translocation in roots of maize seedlings. *Plant Physiol.* **77**, 285-290.
- Saglio, P. H., Drew, M. C. and Pradet, A.** (1988). Metabolic acclimation to anoxia induced by low (2-4 kPa partial pressure) oxygen pretreatment (hypoxia) in root tips of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**, 61-66.
- Saint-Ges, V., Roby, C., Bligny, R., Pradet, A. and Douce, R.** (1991). Kinetic studies of the variations of cytoplasmic pH, nucleotide triphosphates (31P-NMR) and lactate during normoxic and anoxic transitions in maize root tips. *Eur. J. Biochem.* **200**, 477-82.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford, J. C.** (1988). The biolistic process. *Tibtech.* **6**, 299-302.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sanger, M., Daubert, S. and Goodman, R. M.** (1990). Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol. Biol.* **14**, 433-43.

-
- Schledzewski, K. and Mendel, R. R.** (1994). Quantitative transient gene expression: comparison of the promoter for maize polyubiquitin1, rice actin1, maize derived Emu and CaMV 35S in cells of barley, maize and tobacco. *Transgenic Res.* **3**, 249-255.
- Schöffl, F., Rieping, M., Baumann, G., Bevan, M. W., and Angermüller, S.** (1989). The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 246-253.
- Schultz, T. F., Medina, J., Hill, A. and Quatrano, R. S.** (1998). 14-3-3 proteins are part of an abscisic acid-VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the Em promoter and interact with VP1 and EmBP1. *Plant Cell* **10**, 837-47.
- Schulze-Lefert, P., Becker-Andre, M., Schulz, W., Hahlbrock, K. and Dangl, J. L.** (1989). Functional architecture of the light-responsive chalcone synthase promoter from parsley. *Plant Cell* **1**, 707-14.
- Solano, R., Fuertes, A., Sanchez-Pulido, L., Valencia, A. and Paz-Ares, J.** (1997). A single residue substitution causes a switch from the dual DNA binding specificity of plant transcription factor MYB.Ph3 to the animal c-MYB specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, 2889-95.
- Somssich, I. E., Weißhaar, B.** (1996). Expression Library Screening. In *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*, (ed. G. D. F. a. D. Twell), pp. 157-175: John Wiley & Sons Ltd.
- Springer, B., Werr, W., Starlinger, P., Bennett, D. C., Zokolica, M. and Freeling, M.** (1986). The Shrunk gene on chromosome 9 of Zea mays L is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. *Mol. Gen. Genetics* **205**, 461-468.
- Stathopoulos, A. M. and Cyert, M. S.** (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**, 3432-44.
- Steinmann, F. and Brändle, R.** (1984). Carbohydrate and protein metabolism in the rhizomes of the bulrush (*Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla) in relation to natural development of the whole plant. *Aquat. Bot.* **19**, 53-63.

-
- Subbaiah, C. C., Bush, D. S. and Sachs, M. M.** (1994a). Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *Plant Cell* **6**, 1747-1762.
- Subbaiah, C. C., Bush, D. S. and Sachs, M. M.** (1998). Mitochondrial Contribution to the Anoxic Ca²⁺ Signal in Maize Suspension-Cultured Cells. *Plant Physiol.* **118**, 759-771.
- Subbaiah, C. C., Zhang, J. and Sachs, M. M.** (1994b). Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. *Plant Physiol.* **105**, 369-376.
- Thomson, C. J. and Greenway, H.** (1991). Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low oxygen concentrations. *Plant Physiol.* **96**, 1294-1301.
- Töpfer, R., Schell, J. & Steinbiss, H. H.** (1988). Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res.* **16**(17), 8725.
- Trick, M., Dennis, E. S., Edwards, K. J. R. and Peacock, W. J.** (1988). Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase gene family of barley. *Plant Mol. Biol.* **11**, 147-160.
- Urao, T., Noji, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1996). A transcriptional activation domain of ATMYB2, a drought-inducible Arabidopsis Myb-related protein. *Plant J.* **10**, 1145-8.
- Van Toai, T., and Bolles, C.** (1991). Postanoxic injury in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Plant Physiol.* **97**, 588-92.
- Vartapetion, B. B., Andreeva, I. N., Kozlova, G. I., and Agapova, L. P.** (1977). Mitochondrial ultrastructure in roots of mesophyte and hydrophyte at anoxia and glucose feeding. *Protoplasma* **93**, 243-56.
- Verrijzer, C. P. and Tjian, R.** (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 338-42.
- Vogel, J. M., Roth, B., Cigan, M. and Freeling, M.** (1993). Expression of the two maize TATA binding protein genes and function of the encoded TBP proteins by complementation in yeast. *Plant Cell* **5**, 1627-38.

-
- Walker, J. C., Howard, E. A., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.** (1987). DNA sequences required for anaerobic expression of the maize alcohol dehydrogenase 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 6624-6628.
- Wang, J., Goodman, H. M. and Zhang, H.** (1999). An Arabidopsis 14-3-3 protein can act as a transcriptional activator in yeast. *FEBS Lett* **443**, 282-4.
- Washburn, K. B., Davis, E. A. and Ackerman, S.** (1997). Coactivators and TAFs of transcription activation in wheat. *Plant Mol. Biol.* **35**, 1037-43.
- Waters, I., Kuiper, P. J. C., Watkin, E., and Greenway, H.** (1991a). Effects of anoxia on wheat seedlings. I. Interaction between anoxia and other environmental factors. *J. Exp. Bot.* **42**, 1427-35.
- Waters, I., Morrell, S., Greenway, H., and Colmer, T. D.** (1991b). Effects of anoxia on wheat seedlings. II. Influence of O₂ supply prior to anoxia on tolerance to anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. *J. Exp. Bot.* **42**, 1437-47.
- Watson, J. C. and Thompson, W. F.** (1986). Purification and restriction endonucleases analysis of plant nuclear DNA. *Meth. Enzymol.* **118**, 57-75.
- Weisshaar, B., Armstrong, G. A., Block, A., da Costa, e. S. O. and Hahlbrock, K.** (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO* **10**, 1777-86.
- Williams, C. E. and Grotewold, E.** (1997). Differences between plant and animal Myb domains are fundamental for DNA binding activity, and chimeric Myb domains have novel DNA binding specificities. *J Biol Chem* **272**(1), 563-71.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüss, M., Reuter, I. and Schacherer, F.** (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* **28**, 316-9.
- Wingender, E., Karas, H. and Knüppel, R.** (1997). TRANSFAC database as a bridge between sequence data libraries and biological function. *Pac Symp Biocomput*, 477-85.
- Xia, J. H., and Saglio, P. H.** (1992). Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation of maize root tips to anoxia. *Plant Physiol.* **100**, 40-46.

-
- Xia, J. H. and Roberts, J. K. M.** (1994). Improved cytoplasmic pH regulation, increased lactate efflux, and reduced cytoplasmic lactate levels are biochemical traits expressed in root tips of whole maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment. *Plant Physiol.* **105**, 651-57.
- Xie, Y. and Wu, R.** (1989). Rice alcohol dehydrogenase genes: anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones. *Plant Mol. Biol.* **13**, 53-68.
- Xiong, L., Ishitani, M., and Zhu, J. K.** (1999). Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **119**, 205-12.
- Yang, Y. and Klessig, D. F.** (1996). Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 14972-7.
- Yang, Y., Kwon, H. B., Peng, H. P. and Shih, M. C.** (1993). Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **101**, 209-216.
- Yunes, J. A., Vettore, A. L., da Silva, M. J., Leite, A., and Arruda, P.** (1998). Cooperative DNA binding and sequence discrimination by the Opaque2 bZIP factor. *Plant Cell* **10**, 1941-55.
- Zitomer, R. S., and Lowry, C. V.** (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**, 1-11.

7 Anhang

7.1 Promotordeletion transgener Tabak: Einzeldaten

Die Tabelle zeigt die fluorimetrischen Meßdaten (FU/h*µg) der einzelnen transgenen Linien unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Der Mittelwert ergibt sich aus zwei unabhängigen Messungen, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurden. Außerdem ist in der letzten Spalte der absolute Meßwert in pmol 4-MU Substratumsatz angegeben.

7.1.1 5' Promotor-Deletionen

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
5'461-2	11,48	10,66	11,07	0,58	6,2	aerob
5'461-3	79,78	22,82	51,30	40,28	28,5	aerob
5'461-4	35,50	23,64	29,57	8,39	16,4	aerob
5'461-5	31,93	25,30	28,62	4,69	15,9	aerob
5'461-7	98,73	39,16	68,95	42,12	38,3	aerob
5'461-8	29,86	31,24	30,55	0,98	17,0	aerob
5'461-10	16,19	26,14	21,17	7,04	11,8	aerob
5'461-11	102,72	125,43	114,08	16,06	63,4	aerob
5'461-2	14748,00	10694,77	12721,39	2866,07	7067,44	anaerob
5'461-3	32833,24	27853,35	30343,30	3521,31	16857,39	anaerob
5'461-4	29688,15	13173,90	21431,03	11677,34	11906,13	anaerob
5'461-5	34737,48	28119,27	31428,38	4679,78	17460,21	anaerob
5'461-7	62460,83	67977,75	65219,29	3901,05	36232,94	anaerob
5'461-8	7840,24	8550,30	8195,27	502,09	4552,93	anaerob
5'461-10	110627,22	87377,51	99002,37	16440,03	55001,32	anaerob
5'461-11	87635,50	112372,49	100004,00	17491,69	55557,78	anaerob

Linie	1.Experiment FU/h* μ g	2.Experiment FU/h* μ g	Mittelwert FU/h* μ g	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
5'400-1	40,45	31,37	35,91	6,42	19,95	aerob
5'400-2	31,44	31,19	31,32	0,18	17,40	aerob
5'400-3	2,85	3,73	3,29	0,62	1,83	aerob
5'400-4	44,47	35,24	39,86	6,53	22,14	aerob
5'400-5	19,31	12,64	15,98	4,72	8,88	aerob
5'400-8	44,32	38,77	41,55	3,92	23,08	aerob
5'400-9	9,57	11,58	10,58	1,42	5,88	aerob
5'400-10	83,86		83,86		46,59	aerob
5'400-1	29353,60	26399,48	27876,54	2088,88	15486,97	anaerob
5'400-2	1318,87	1295,81	1307,34	16,31	726,30	anaerob
5'400-3	652,95	639,96	646,46	9,19	359,14	anaerob
5'400-4	18990,56	12807,38	15898,97	4372,17	8832,76	anaerob
5'400-5	7878,40	7112,59	7495,50	541,51	4164,17	anaerob
5'400-8	22513,84	30573,92	26543,88	5699,34	14746,60	anaerob
5'400-9	26137,28	15209,47	20673,38	7727,13	11485,21	anaerob
5'400-10	4220,18		4220,18		2344,54	anaerob
5'300-1	25,15	22,40	23,78	1,94	13,21	aerob
5'300-2	11,00	11,69	11,35	0,49	6,31	aerob
5'300-5	9,41	8,10	8,76	0,93	4,87	aerob
5'300-6	1,45	2,50	1,98	0,74	1,10	aerob
5'300-9	16,95	16,27	16,61	0,48	9,23	aerob
5'300-10	7,37	6,04	6,71	0,94	3,37	aerob
5'300-1	10788,24	11003,16	10895,70	151,97	6053,17	anaerob
5'300-2	13075,62	13622,45	13349,04	386,67	7416,13	anaerob
5'300-5	6205,90	7605,77	6905,84	989,86	3836,58	anaerob
5'300-6	2970,63	3229,43	3100,03	183,00	1722,24	anaerob
5'300-9	15032,34	12666,15	13849,25	1673,15	7694,03	anaerob
5'300-10	1038,68	1163,77	1101,23	88,45	611,79	anaerob

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
5'280-1	13,28	12,21	12,75	0,76	7,08	aerob
5'280-2	7,34	6,31	6,83	0,73	3,79	aerob
5'280-3	13,59	21,02	17,31	5,25	9,62	aerob
5'280-4	6,95	3,32	5,14	2,57	2,86	aerob
5'280-5	17,70	14,68	16,19	2,14	8,99	aerob
5'280-6	2,87	3,15	3,01	0,20	1,67	aerob
5'280-7	22,96	19,53	21,25	2,43	11,81	aerob
5'280-8	26,54	28,81	27,68	1,61	15,38	aerob
5'280-9	6,83	8,96	7,90	1,51	4,39	aerob
5'280-1	408,19	289,13	348,66	84,19	193,70	anaerob
5'280-2	11,18	11,77	11,48	0,42	6,38	anaerob
5'280-3	1215,20	624,08	919,64	417,98	510,91	anaerob
5'280-4	10,65	20,41	15,53	6,90	8,63	anaerob
5'280-5	1105,40	1641,27	1373,34	378,92	762,97	anaerob
5'280-6	25,15	24,08	24,62	0,76	13,68	anaerob
5'280-7	6433,37	4960,80	5697,09	1041,26	3165,05	anaerob
5'280-8	4353,90	3534,74	3944,32	579,23	2191,29	anaerob
5'280-9	1855,38	1657,82	1756,60		975,89	anaerob
5'250-1	27,50	9,70	18,60	12,59	10,33	aerob
5'250-2	17,52	16,43	16,98		9,43	aerob
5'250-5	7,39	3,64	5,52	2,65	3,07	aerob
5'250-6	2,11	5,83	3,97	2,63	2,21	aerob
5'250-8	4,94	4,81	4,88	0,09	2,71	aerob
5'250-9	31,10	35,49	33,30	3,10	18,50	aerob
5'250-10	2,90	7,62	5,26	3,34	2,92	aerob
5'250-11	12,00	16,60	14,30	3,25	7,94	aerob
5'250-1	89,50	678,61	384,06	416,56	213,37	anaerob
5'250-2	563,67	500,47	532,07	44,69	295,59	anaerob
5'250-5	111,65	135,47	123,56	16,84	68,64	anaerob
5'250-6	797,38	836,20	816,79	27,45	453,77	anaerob
5'250-8	538,48	284,09	411,29	179,88	228,49	anaerob

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert Zustand pmol 4- MU/Min*mg	
5'250-9	2924,58	3395,90	3160,24	333,27	1755,69	anaerob
5'250-10	1937,19	2341,04	2139,12	285,57	1188,40	anaerob
5'250-11	914,37	618,77	766,57	209,02	425,87	anaerob
5'210-1	157,59	193,55	175,57	25,43	97,54	aerob
5'210-2	5,61	8,10	6,86	1,76	3,81	aerob
5'210-3	16,06	12,94	14,50	2,21	8,06	aerob
5'210-4	26,11	19,38	22,75	4,76	12,64	aerob
5'210-5	50,56	37,22	43,89	9,43	24,38	aerob
5'210-8	135,35	75,35	105,35	42,43	58,53	aerob
5'210-9	41,10	54,11	47,61	9,20	26,45	aerob
5'210-10	174,27	23,45	98,86	106,65	54,92	aerob
5'210-1	300,31	295,98	298,15	3,06	165,64	anaerob
5'210-2	10,24	9,31	9,78	0,66	5,43	anaerob
5'210-3	18,49	17,65	18,07	0,59	10,04	anaerob
5'210-4	29,97	13,95	21,96	11,33	12,20	anaerob
5'210-5	75,75	69,35	72,55	4,53	40,31	anaerob
5'210-8	1111,40	982,51	1046,96	91,14	581,64	anaerob
5'210-9	299,35	318,12	308,74	13,27	171,52	anaerob
5'210-10	9,23	11,38	10,31	1,52	5,73	anaerob
5'190-1	18,60	25,95	22,28	5,20	12,38	aerob
5'190-2	42,39	22,49	32,44	14,07	18,02	aerob
5'190-4	46,40	17,82	32,11	20,21	17,84	aerob
5'190-5	7,95		7,95		4,42	aerob
5'190-6	47,08	56,00	51,54	6,31	28,63	aerob
5'190-7	12,52	19,74	16,13	5,11	8,96	aerob
5'190-8	2,27	1,07	1,67	0,85	0,93	aerob
5'190-9	19,82	33,65	26,74	9,78	14,86	aerob
5'190-10	9,51	12,12	10,82	1,85	6,01	aerob
5'190-1	289,64	232,92	261,28	40,11	145,16	anaerob
5'190-2	136,97	90,95	113,96	32,54	63,31	anaerob
5'190-4	3789,85	2744,37	3267,11	739,27	1815,06	anaerob
5'190-5	207,98		207,98		115,54	anaerob

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
5'190-6	275,14	315,28	295,21	28,38	164,01	anaerob
5'190-7	786,52	245,50	516,01	382,56	286,67	anaerob
5'190-8	29,87	34,98	32,43	3,61	18,02	anaerob
5'190-9	189,70	139,38	164,54	35,58	91,41	anaerob
5'190-10	7,13	8,17	7,65	0,74	4,25	anaerob
5'150-1	30,09	31,65	30,87	1,10	17,15	aerob
5'150-2	165,14	93,34	129,24	50,77	71,80	aerob
5'150-3	60,25	42,13	51,19	12,81	28,44	aerob
5'150-4	13,05	15,22	14,14	1,53	7,86	aerob
5'150-5	161,94	126,41	144,18	25,12	80,10	aerob
5'150-6	3,57	2,77	3,17	0,57	1,76	aerob
5'150-7	56,99	57,53	57,26	0,38	31,81	aerob
5'150-8	14,12	13,07	13,60	0,74	7,56	aerob
5'150-9	30,00		30,00		16,67	aerob
5'150-10	2,92		2,92		1,62	aerob
5'150-1	34,87	27,59	31,23	5,15	17,35	anaerob
5'150-2	250,64	157,61	204,13	65,78	113,41	anaerob
5'150-3	43,62	26,22	34,92	12,30	19,40	anaerob
5'150-4	24,34	18,43	21,39	4,18	11,88	anaerob
5'150-5	105,87	79,24	92,56	18,83	51,42	anaerob
5'150-6	9,44	6,15	7,80	2,33	4,33	anaerob
5'150-7	69,19	46,67	57,93	15,92	32,18	anaerob
5'150-8	135,22	138,22	136,72	2,12	75,96	anaerob
5'150-9	58,67		58,67		32,59	anaerob
5'150-10	3,53		3,53		1,96	anaerob
					4,75	
5'100-2	7,86	9,23	8,55	0,97		aerob
5'100-3	9,37	15,03	12,20	4,00	6,78	aerob
5'100-4	7,59	7,19	7,39	0,28	4,11	aerob
5'100-5	13,28	6,92	10,10	4,50	5,61	aerob
5'100-8	34,61	28,73	31,67	4,16	17,59	aerob
5'100-9	10,98	15,24	13,11	3,01	7,28	aerob
5'100-10	8,82	23,56	16,19	10,42	8,99	aerob

Linie	1.Experiment FU/h* μ g	2.Experiment FU/h* μ g	Mittelwert FU/h* μ g	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
5'100-2	6,16	8,13	7,15	1,39	3,97	anaerob
5'100-3	5,20	11,54	8,37	4,48	4,65	anaerob
5'100-4	3,26	4,16	3,71	0,64	2,06	anaerob
5'100-5	9,26	9,25	9,26	0,01	5,14	anaerob
5'100-8	6,20	195,71	100,96	134,00	56,09	anaerob
5'100-9	42,20	218,11	130,16	124,39	72,31	anaerob
5'100-10	185,50	238,40	211,95	37,41	117,75	anaerob

7.1.2 3'Promotor-Deletionen

Linie	1.Experiment FU/h* μ g	2.Experiment FU/h* μ g	Mittelwert FU/h* μ g	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
3'100-1	70,35	64,18	67,27	4,36	37,37	aerob
3'100-2	32,26	41,14	36,70	6,28	20,39	aerob
3'100-3	95,03	115,76	105,40	14,66	58,56	aerob
3'100-5	73,63	85,20	79,42	8,18	44,12	aerob
3'100-6	22,11	24,55	23,33	1,73	12,96	aerob
3'100-7	69,93	53,26	61,60	11,79	34,22	aerob
3'100-8	24,22	24,55	24,39	0,23	13,55	aerob
3'100-1	59488,76	35177,91	47333,34	17190,37	26296,30	anaerob
3'100-2	23574,30	16780,87	20177,59	4803,68	11209,77	anaerob
3'100-3	170320,47	118288,76	144304,62	36791,97	80169,23	anaerob
3'100-5	48908,88	43197,87	46053,38	4038,29	25585,21	anaerob
3'100-6	46872,14	84596,45	65734,30	26675,12	36519,06	anaerob
3'100-7	16774,67	10983,94	13879,31	4094,66	7710,73	anaerob
3'100-8	2003,43	1819,28	1911,36	130,21	1061,87	anaerob
3'150-1	44,69	213,64	129,17	119,47	71,76	aerob
3'150-2	71,35	155,47	113,41	59,48	63,01	aerob
3'150-3	198,73	191,87	195,30	4,85	108,50	aerob
3'150-4	5,55	5,77	5,66	0,16	3,14	aerob

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
3'150-6	49,37	49,30	49,34	0,05	27,41	aerob
3'150-7	139,23	136,85	138,04	1,68	76,69	aerob
3'150-8	34,69	28,36	31,53	4,48	17,52	aerob
3'150-9	36,18	34,74	35,46	1,02	19,70	aerob
3'150-10	4,65		4,65		2,58	aerob
3'150-1	46656,18		46656,18		25920,10	anaerob
3'150-2	39285,68	40028,26	39656,97	525,08	22031,65	anaerob
3'150-3	13213,67	12382,96	12798,32	587,40	7110,18	anaerob
3'150-4	8048,76	7971,44	8010,10	54,67	4450,06	anaerob
3'150-6	9711,05	7750,77	8730,91	1386,13	4850,51	anaerob
3'150-7	9501,78	10263,91	9882,85	538,91	5490,47	anaerob
3'150-8	23666,75	22879,68	23273,22	556,54	12929,57	anaerob
3'150-9	12714,50	10397,63	11556,07	1638,27	6420,04	anaerob
3'150-10	147,55		147,55		81,97	anaerob
3'190-2	84,87	93,30	89,09	5,96	49,49	aerob
3'190-3	46,04	31,72	38,88	10,13	21,60	aerob
3'190-4	60,06	42,35	51,21	12,52	28,45	aerob
3'190-5	133,29	103,41	118,35	21,13	65,75	aerob
3'190-6	21,23	24,29	22,76	2,16	12,64	aerob
3'190-7	10,87	6,89	8,88	2,81	4,93	aerob
3'190-8	67,78	52,37	60,08	10,90	33,38	aerob
3'190-9	84,68	75,64	80,16	6,39	44,53	aerob
3'190-10	16,95	16,87	16,91	0,06	9,39	aerob
3'190-2	96480,20	42541,34	69510,77	38140,53	38617,09	aerob
3'190-3	33198,58	26375,46	29787,02	4824,67	16548,34	aerob
3'190-4	52928,68	91325,88	72127,28	27150,92	40070,71	aerob
3'190-5	23822,49	22176,57	22999,53	1163,84	12777,52	aerob
3'190-6	16589,94	13562,56	15076,25	2140,68	8375,69	aerob
3'190-7	10163,53	11505,46	10834,50	948,89	6019,17	aerob
3'190-8	30000,84	34155,42	32078,13	2937,73	17821,18	aerob
3'190-9	89635,03	79797,69	84716,36	6956,05	47064,64	aerob
3'190-10	36924,89	25336,29	31130,59	8194,38	17294,77	aerob

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
3'210-2	138,78	22,84	80,81	81,98	44,89	aerob
3'210-3	15,16	13,55	14,36	1,14	7,98	aerob
3'210-4	19,47		19,47		10,82	aerob
3'210-5	62,06	70,83	66,45	6,20	36,92	aerob
3'210-6	153,96	159,87	156,92	4,18	87,18	aerob
3'210-8	7,82	7,73	7,78	0,06	4,32	aerob
3'210-9	2,63	4,03	3,33	0,99	1,85	aerob
3'210-10	44,82	57,85	51,34	9,21	28,52	aerob
3'210-2	32894,29	32998,26	32946,28	73,52	18303,49	anaerob
3'210-3	18772,89	19704,66	19238,78	658,86	10688,21	anaerob
3'210-4	7861,56		7861,56		4367,53	anaerob
3'210-5	38422,72	45149,51	41786,12	4756,56	23214,51	anaerob
3'210-6	24713,12	25130,77	24921,95	295,32	13845,53	anaerob
3'210-8	7745,56	8250,89	7998,23	357,32	4443,46	anaerob
3'210-9	8,51	9,23	8,87	0,51	4,93	anaerob
3'210-10	23528,21	23919,53	23723,87	276,71	13179,93	anaerob
3'250-1	28,77	52,74	40,76	16,95	22,64	aerob
3'250-3	7,02	6,81	6,92	0,15	3,84	aerob
3'250-4	70,29	72,97	71,63	1,90	39,79	aerob
3'250-5	13,51	33,07	23,29	13,83	12,94	aerob
3'250-6	26,03	22,46	24,25	2,52	13,47	aerob
3'250-7	11,10	17,51	14,31	4,53	7,95	aerob
3'250-8	4,94	4,81	4,88	0,09	2,71	aerob
3'250-9	12,75	14,37	13,56	1,15	7,53	aerob
3'250-10	49,76		49,76		27,64	aerob
3'250-1	612,00	548,00	580,00	45,25	322,22	anaerob
3'250-3	5050,10	5699,61	5374,86	459,27	2986,03	anaerob
3'250-4	2407,85	2573,80	2490,83	117,34	1383,79	anaerob
3'250-5	13166,07	13576,96	13371,52	290,54	7428,62	anaerob
3'250-6	66186,04	71156,45	68671,25	3514,61	38150,69	anaerob
3'250-7	63144,62	57484,32	60314,47	4002,44	33508,04	anaerob
3'250-8	4,39	5,96	5,18	1,11	2,88	anaerob
3'250-9	28444,02	28900,47	28672,25	322,76	15929,03	anaerob

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
3'250-10	80001,48		80001,48		44445,27	anaerob
3'280-1	79,81	52,85	66,33	19,06	36,85	aerob
3'280-2	12,80	13,16	12,98	0,25	7,21	aerob
3'280-3	74,56	52,46	63,51	15,63	35,28	aerob
3'280-4	11,37	2,98	7,18	5,93	3,99	aerob
3'280-5	24,28	18,30	21,29	4,23	11,83	aerob
3'280-8	6,33	8,00	7,17	1,18	3,98	aerob
3'280-9	4,22		4,22		2,34	aerob
3'280-10	1,00	2,24	1,62	0,88	0,90	aerob
3'280-1	20759,78	21570,51	21165,15	573,27	11758,42	anaerob
3'280-2	10042,23		10042,23		5579,02	anaerob
3'280-3		20803,56	20803,56		11557,53	anaerob
3'280-4	398,05	805,57	601,81	288,16	334,34	anaerob
3'280-5	7196,99	8587,42	7892,21	983,18	4384,56	anaerob
3'280-8	161,54	118,62	140,08	30,35	77,82	anaerob
3'280-9	676,57		676,57		375,87	anaerob
3'280-10	2527,69	2427,34	2477,52	70,96	1376,40	anaerob
3'300-1	10,96	11,28	11,12	0,23	6,18	aerob
3'300-2	15,65	9,46	12,56	4,38	6,98	aerob
3'300-3	12,08	5,73	8,91	4,49	4,95	aerob
3'300-5	17,92	23,96	20,94	4,27	11,63	aerob
3'300-6	10,27	10,89	10,58	0,44	5,88	aerob
3'300-7	11,28	12,32	11,80	0,74	6,56	aerob
3'300-8	29,87	31,85	30,86	1,40	17,14	aerob
3'300-9	19,32	19,98	19,65	0,47	10,92	aerob
3'300-10	14,53	17,65	16,09	2,21	8,94	aerob
3'300-1	111,34	72,90	92,12	27,18	51,18	anaerob
3'300-2	1503,47	1463,19	1483,33	28,48	824,07	anaerob
3'300-3	1597,46	1540,46	1568,96	40,31	871,64	anaerob
3'300-5	5905,50	6770,59	6338,05	611,71	3521,14	anaerob
3'300-6	1748,89	1576,51	1662,70	121,89	923,72	anaerob

Linie	1.Experiment FU/h*µg	2.Experiment FU/h*µg	Mittelwert FU/h*µg	Std-Abw.	Mittelwert pmol 4- MU/Min*mg	Zustand
3'300-7	3124,73	3418,70	3271,72	207,87	1817,62	anaerob
3'300-8	1352,65	1253,53	1303,09	70,09	723,94	anaerob
3'300-9	648,86	638,59	643,73	7,26	357,63	anaerob
3'300-10	128,58	111,31	119,95	12,21	66,64	anaerob
3'400-1	10,90	6,62	8,76	3,03	4,87	aerob
3'400-2	39,57	38,67	39,12	0,64	21,73	aerob
3'400-3	19,96	25,08	22,52	3,62	12,51	aerob
3'400-4	28,06	86,88	57,47	41,59	31,93	aerob
3'400-5	34,58		34,58		19,21	aerob
3'400-6	10,51	15,42	12,97	3,47	7,21	aerob
3'400-7	34,06	35,67	34,87	1,14	19,37	aerob
3'400-8	9,72	20,10	14,91	7,34	8,28	aerob
3'400-9	24,98	21,65	23,32	2,35	12,96	aerob
3'400-10	21,10	24,50	22,80	2,40	12,67	aerob
3'400-1	321,24	710,95	516,10	275,57	286,72	anaerob
3'400-2	190,65	107,05	148,85	59,11	82,69	anaerob
3'400-3	310,48	257,18	283,83	37,69	157,68	anaerob
3'400-4	1295,56	1328,32	1311,94	23,16	728,86	anaerob
3'400-5	479,11		479,11		266,17	anaerob
3'400-6	142,54	88,85	115,70	37,96	64,28	anaerob
3'400-7	1667,40	1820,17	1743,79	108,02	968,77	anaerob
3'400-8	244,46	197,64	221,05	33,11	122,81	anaerob
3'400-9	1060,10	1312,43	1186,27	178,42	659,04	anaerob
3'400-10	1549,83	1631,95	1590,89	58,07	883,83	anaerob

7.2 Anaerobe Induktion und Segregation (Einzeldaten)

In den folgenden Tabellen werden die Einzeldaten der Segregation und der anaeroben Induktion wiedergegeben. Die anaerobe Induktion ergibt sich aus dem Quotienten aerober und anaerober Expression (siehe 7.1). Hierfür wurden die Mittelwerte aus beiden Experimenten verwendet.

Linie	Induktion	Segregation Kan ^{sens.} /Kan ^{res.}	Linie	Induktion	Segregation Kan ^{sens.} /Kan ^{res.}
5'461-2	1.149	1:5	5'400-1	776	1:96
5'461-3	591	?	5'400-2	42	1:29
5'461-4	725	1:16	5'400-3	196	1:4
5'461-5	1.098	1:19	5'400-4	399	1:3
5'461-7	946	1:32	5'400-5	469	1:5
5'461-8	268	1:4	5'400-8	639	1:32
5'461-10	4.678	1:5	5'400-9	1.955	1:3
5'461-11	877	1:32	5'400-10	50	?
5'300-1	458	1:5	5'280-1	27	1:3
5'300-2	1.177	1:10	5'280-2	2	1:31
5'300-5	789	1:3	5'280-3	53	1:9
5'300-6	1.570	1:10	5'280-4	3	1:8
5'300-9	834	1:5	5'280-5	85	1:32
5'300-10	164	1:12	5'280-6	8	1:5
			5'280-7	268	1:11
			5'280-8	143	1:3
			5'280-9	222	1:33
5'250-1	21	1:10	5'210-1	2	1:19
5'250-2	31	1:33	5'210-2	1	1:25
5'250-5	22	1:3	5'210-3	1	1:16
5'250-6	206	1:4	5'210-4	1	1:4
5'250-8	84	1:3	5'210-5	2	1:4
5'250-9	95	1:20	5'210-8	10	1:11
5'250-10	407	1:30	5'210-9	6	1:4
5'250-11	54	1:6	5'210-10	0	1:30

Linie	Induktion	Segregation Kan ^{sens.} /Kan ^{res.}	Linie	Induktion	Segregation Kan ^{sens.} /Kan ^{res.}
5'190-1	12	1:45	5'150-1	1	1:31
5'190-2	4	1:5	5'150-2	2	1:4
5'190-4	102	1:86	5'150-3	1	1:12
5'190-5	26	?	5'150-4	2	1:5
5'190-6	6	1:4	5'150-5	1	1:12
5'190-7	32	1:4	5'150-6	2	?
5'190-8	19	1:3	5'150-7	1	1:32
5'190-9	6	?	5'150-8	10	1:3
5'190-10	1	?	5'150-9	2	?
			5'150-10	1	?
5'100-2	1	1:5	wt	2	-
5'100-3	1	1:15	pOCA28	2	3
5'100-4	1	1:4	pGUS3-3	1	3
5'100-5	1	1:5	4040-3	153	3
5'100-8	3	1:31	pRT99	1	3
5'100-9	10	1:4			
5'100-10	13	1:6			

7.3 Promotorrekonstruktion: transiente Expressionsstudien in Tabakblättern (Einzeldaten)

In den folgenden Tabellen werden die einzelnen Meßdaten der transienten Expressionsstudien gezeigt. Doppellinien trennen die unabhängigen Experimente voneinander. Die Luziferasewerte (Luc) und Proteinwerte wurden zur Korrektur der relativen Fluoreszenzwerte herangezogen. Daher sind alle relativen Fluoreszenzwerte direkt miteinander vergleichbar (siehe dazu auch 2.11.6.). Werte die mit einem (-) versehen sind, wurden in die Berechnung des Mittelwertes nicht mit einbezogen.

Linie	rel.FU/h	korr. FU/h	Luc-Wert	RLU	Protein-wert	RPU	relative Promotor-aktivität	rel. Promotor-aktivität (Mittelwert)	Std.-Abw.	Zustand
Kontrolle	22,00	-	196	-	0,89	0,53				
35S CaMV	125,00	103,00	13.073	0,06	1,14	0,68	2.379,95			
35S CaMV	83,00	61,00	8.255	0,04	1,27	0,76	2.018,42			24h
35S CaMV	220,00	198,00	30.963	0,15	0,85	0,51	2.559,07	2.155,12	298,98	aerob
35S CaMV	247,00	225,00	37.332	0,18	0,97	0,58	2.125,26			
35S CaMV	139,00	117,00	25.322	0,12	0,93	0,56	1.692,90			
Kontrolle	22,00	-	196	-	0,89	0,53	109,10			
5'-461	79,80	57,80	29.266	0,14	0,52	0,31	1.289,53(-)	212,88	110,63	24h
5'-461	41,20	19,20	22.625	0,11	0,79	0,47	366,16			aerob
5'-461	40,00	18,00	39.911	0,20	0,94	0,56	163,37			
5'-461	32,00	10,00	28.929	0,14	1,08	0,65	109,10			
Kontrolle	15,00	-	120	-	0,87	0,52				
5'-461	36,20	21,20	7.628	0,04	0,93	0,56	1.029,14			
5'-461	35,60	20,60	6.618	0,03	0,88	0,52	1.226,60			24h
5'-461	86,20	71,20	29.413	0,14	0,60	0,36	1.374,61	1.556,94	443,88	anaerob
5'-461	201,00	186,00	22.776	0,11	0,90	0,53	3.109,10 (-)			
5'-461	77,20	62,20	11.397	0,06	0,95	0,57	1.970,09			
5'-461	417,80	402,80	63.842	0,31	0,98	0,59	2.184,25			

Linie	rel.FU/h	korr. FU/h	Luc- Wert	RLU	Protein- wert	RPU	relative Promotor- aktivität	rel. Promotor- aktivität (Mittelwert)	Std.- Abw.	Zustand
Kontrolle	42,00	-	170	-	0,86	0,51				
4xARE	73,40	31,40	60.361	0,30	1,23	0,73	144,00			
4xARE	45,20	3,20	23.817	0,12	0,72	0,43	63,50			24h
4xARE	25,60	-16,40	11.216	0,05	1,04	0,62	-	122,03	41,81	aerob
4xARE	112,60	70,60	37.792	0,19	1,03	0,61	619,26(-)			
4xARE	63,60	21,60	38.611	0,19	1,20	0,72	158,58			
4xARE	31,60	- 10,40	25.415	0,12	1,05	0,63	-			
Kontrolle	7,40	-	184	-	0,74	0,44				
4xARE	55,40	48,00	11.971	0,06	1,25	0,74	1.107,77			
4xARE	55,60	48,20	20.923	0,10	1,00	0,60	785,24			24h
4xARE	79,80	72,40	55.230	0,27	1,02	0,61	437,84 (-)	934,87	223,31	anaerob
4xARE	124,20	116,80	42.107	0,21	1,05	0,62	904,38			
4xARE	20,00	12,60	6.524	0,03	1,08	0,64	625,37			
4xARE	35,40	28,00	7.204	0,03	1,08	0,65	1.251,62			
Kontrolle	32,80	-	172	-	1,10	0,66				
1x ARE	40,00	7,20	22.278	0,11	0,81	0,48	136,41			
1x ARE	41,60	8,80	41.965	0,21	1,32	0,79	53,99			24h
1x ARE	75,80	43,00	40.025	0,20	1,33	0,79	276,24	179,50	110,64	aerob
1x ARE	54,80	22,00	60.643	0,30	1,38	0,82	89,63			
1x ARE	92,00	59,20	47.865	0,24	1,23	0,74	341,24			
Kontrolle	8,80	-	242	-	0,64	0,38				
1x ARE	26,60	17,80	13.619	0,07	0,74	0,44	606,51			
1x ARE	18,20	9,40	10.867	0,05	0,69	0,41	435,44			24h
1x ARE	25,00	16,20	25.298	0,12	0,64	0,38	343,66	401,77	140,48	anaerob
1x ARE	13,70	4,90	8.625	0,04	0,90	0,53	221,48			
1x ARE	8,90	0,10	5.326	0,03	0,54	0,32	12,26 (-)			

Linie	rel.FU/h	korr. FU/h	Luc- Wert	RLU	Protein- wert	RPU	relative Promotor- aktivität	rel. Promotor- aktivität (Mittelwert)	Std.- Abw.	Zustand
Kontrolle	32,80	-	172	-	1,10	0,66				
1x ARE	40,00	7,20	22.278	0,11	0,81	0,48	136,41			
1x ARE	41,60	8,80	41.965	0,21	1,32	0,79	53,99			24h
1x ARE	75,80	43,00	40.025	0,20	1,33	0,79	276,24	179,50	110,64	aerob
1x ARE	54,80	22,00	60.643	0,30	1,38	0,82	89,63			
1x ARE	92,00	59,20	47.865	0,24	1,23	0,74	341,24			
Kontrolle	8,80	-	242	-	0,64	0,38				
1x ARE	26,60	17,80	13.619	0,07	0,74	0,44	606,51			
1x ARE	18,20	9,40	10.867	0,05	0,69	0,41	435,44			24h
1x ARE	25,00	16,20	25.298	0,12	0,64	0,38	343,66	401,77	140,48	anaerob
1x ARE	13,70	4,90	8.625	0,04	0,90	0,53	221,48			
1x ARE	8,90	0,10	5.326	0,03	0,54	0,32	12,26 (-)			
Kontrolle	29,20	-	116	-	0,27	0,16				
ASB	42,40	13,20	18.645	0,09	0,62	0,37	389,90			24 h
ASB	36,20	7,00	18.867	0,09	0,71	0,42	178,42			aerob
ASB	38,20	9,00	15.907	0,08	0,65	0,39	297,54	253,70	80,16	
ASB	36,20	7,00	18.675	0,09	0,69	0,41	185,49			
ASB	33,70	4,50	19.068	0,09	0,37	0,22	217,17			
Kontrolle	4,80	-	319	-	0,31	0,19				
ASB	47,00	42,20	30.455	0,15	0,54	0,32	887,28			
ASB	81,80	77,00	66.604	0,33	0,48	0,28	825,55			24h
ASB	83,80	79,00	49.401	0,24	0,59	0,35	923,22	870,85	37,47	anaerob
ASB	42,00	37,20	23.356	0,11	0,65	0,39	847,37			

Linie	rel.FU/h	korr. FU/h	Luc- Wert	RLU	Protein- wert	RPU	relative Promotor- aktivität	rel. Promotor- aktivität (Mittelwert)	Std.- Abw.	Zustand
Kontrolle	24,40	-	297	-	1,53	1,00				
4xARE-Mu1	44,00	19,60	22.568	0,11	1,40	0,91	194,96			24h
4xARE-Mu1	32,00	7,60	11.180	0,05	1,39	0,91	155,93	154,63	40,89	aerob
4xARE-Mu1	36,00	11,60	19.118	0,09	1,06	0,69	179,60			
4xARE-Mu1	28,00	3,60	11.160	0,05	1,17	0,76	88,03			
Kontrolle	18,60	-	244	0,00	0,99	0,59				
4xARE-Mu1	39,40	20,80	12.406	0,06	1,03	0,61	566,96			24h
4xARE-Mu1	26,00	7,40	9.734	0,05	0,43	0,26	612,52	510,61	90,61	anaerob
4xARE-Mu1	35,80	17,20	17.302	0,08	0,89	0,53	385,78			
4xARE-Mu1	30,20	11,60	23.617	0,12	0,37	0,22	459,96			
Kontrolle	25,10	-	107	-	0,62	0,37				
4xARE-Mu-2	48,90	23,80	74.761	0,37	0,77	0,46	140,32			24h
4xARE-Mu-2	63,80	38,70	66.394	0,33	0,84	0,50	237,27	145,05	57,72	aerob
4xARE-Mu-2	37,70	12,60	47.248	0,23	0,74	0,44	123,40			
4xARE-Mu-2	53,10	28,00	161.295	0,80	0,74	0,44	79,23			
Kontrolle	16,90	-	287,00	-	0,76	0,45				
4xARE-Mu-2	25,10	8,20	287	0,07	0,67	0,40	293,66			
4xARE-Mu-2	31,00	14,10	14.396	0,07	0,72	0,43	470,65			
4xARE-Mu-2	24,20	7,30	14.473	0,10	0,76	0,45	165,66 (-)			
4xARE-Mu-2	38,80	21,90	19.894	0,09	0,77	0,46	502,24			
Kontrolle	44,40	-	294	-	1,49	0,89		404,01	85,50	24h
4xARE-Mu-2	6,20	- 38,20	148.696	0,73	1,13	0,68	-			anaerob
4xARE-Mu-2	40,40	-4,00	83.526	0,41	1,13	0,68	-			
4xARE-Mu-2	56,80	12,40	19.922	0,10	1,39	0,83	154,65 (-)			
4xARE-Mu-2	32,00	- 12,40	29.941	0,15	1,56	0,93	-			
4xARE-Mu-2	92,40	48,00	28.093	0,14	1,68	1,00	349,49			
4xARE-Mu-2	42,80	-1,60	15.922	0,08	1,27	0,76	-			

Linie	rel.FU/h	korr. FU/h	Luc- Wert	RLU	Protein- wert	RPU	relative Promotor- aktivität	rel. Promotor- aktivität (Mittelwert)	Std.- Abw.	Zustand
Kontrolle	31,40	-	121	-	0,78	0,47				24h aerob
4xARE-Mu-3	66,70	35,30	69.319	0,34	0,83	0,50	208,05			
4xARE-Mu-3	87,40	56,00	79.516	0,39	0,80	0,48	299,17			
4xARE-Mu-3	97,90	66,50	81.791	0,40	0,85	0,51	325,43	233,65	72,30	
4xARE-Mu-3	166,30	134,90	93.686	0,46	0,68	0,40	723,71 (-)			
4xARE-Mu-3	86,50	55,10	132.850	0,66	0,75	0,45	188,57			
4xARE-Mu-3	115,10	83,70	134.360	0,66	0,79	0,47	268,49			
4xARE-Mu-3	86,60	55,20	202.701	1,00	0,82	0,49	112,21			
Kontrolle	22,90	-	485	-	0,82	0,49				24h anaerob
4xARE-Mu-3			27.767	0,13	0,79	0,47	-			
4xARE-Mu-3	35,70	12,80	17.384	0,08	0,86	0,52	296,94			
4xARE-Mu-3	25,70	2,80	15.997	0,08	0,84	0,50	72,70			
Kontrolle	44,40	-	294	-	1,49	0,89				
4xARE-Mu-3	48,80	4,40	40.388	0,20	0,89	0,53	41,66	214,00	129,40	
4xARE-Mu-3	70,90	26,50	28.232	0,14	0,93	0,55	346,16			
4xARE-Mu-3	16,20	- 28,20	21.766	0,11	1,16	0,69	-			
4xARE-Mu-3	76,40	32,00	30.066	0,15	1,17	0,70	312,52			
4xARE-Mu-3	26,40	- 18,00	14.984	0,07	1,25	0,75	-			
Kontrolle	28,00	-	192	-	0,90	0,54				24h aerob
4xARE-Mu-4	34,20	6,20	42.369	0,21	0,39	0,23	127,20			
4xARE-Mu-4	24,40	-3,60	8.604	0,04	0,65	0,39	-	136,46	74,23	
4xARE-Mu-4	14,40	-13,60	6.825	0,03	0,81	0,48	-			
4xARE-Mu-4	34,80	6,80	14.002	0,07	0,72	0,43	231,65			
4xARE-Mu-4	30,60	2,60	33.371	0,16	0,53	0,31	50,53			
Kontrolle	35,20	-	197	-	1,45	0,87				24h anaerob
4xARE-Mu-4	65,20	30,00	11.262	0,05	1,15	0,69	798,26			
4xARE-Mu-4	43,20	8,00	2.330	0,01	1,38	0,82	921,77	825,97	69,72	
4xARE-Mu-4	58,40	23,20	7.458	0,04	1,43	0,85	757,89			
4xARE-Mu-4	35,00	-0,20	5.595	0,03	1,07	0,64	-			

Linie	rel.FU/h	korr. FU/h	Luc- Wert	RLU	Protein- wert	RPU	relative Promotor- aktivität	rel. Promotor- aktivität (Mittelwert)	Std.- Abw.	Zustand
Kontrolle	28,00	-	192	-	0,90	0,54				
4xARE-Mu-5	37,40	9,40	19.493	0,10	0,52	0,31	320,77			
4xARE-Mu-5	23,80	-4,20	18.276	0,09	0,62	0,37	-			24h
4xARE-Mu-5	35,60	7,60	10.427	0,05	0,68	0,40	373,15	292,96	79,30	aerob
4xARE-Mu-5	34,00	6,00	19.947	0,10	0,56	0,33	184,96			
4xARE-Mu-5	25,40	-2,60	16.220	0,08	0,72	0,43	-			
Kontrolle	35,20	-	197,00	-	1,45	0,87				
4xARE-Mu-5	44,60	9,40	3.594	0,02	1,02	0,61	924,59			
4xARE-Mu-5	104,60	69,40	23.925	0,12	1,13	0,68	875,62	1.074,76	178,08	24h
4xARE-Mu-5	89,80	54,60	12.387	0,06	1,26	0,75	1.206,73			anaerob
4xARE-Mu-5	88,40	53,20	27.368	0,13	0,51	0,31	1.292,09			
Kontrolle	28,00	-	192	-	0,90	0,54				
3'100-TATA	42,00	14,00	18.286	0,09	0,70	0,42	373,87			
3'100-TATA	42,60	14,60	16.620	0,08	0,88	0,52	343,74			24h
3'100-TATA	40,30	12,30	13.160	0,06	0,94	0,56	343,36	334,58	43,09	aerob
3'100-TATA	30,00	2,00	4.046	0,02	0,70	0,42	251,47			
3'100-TATA	30,60	2,60	4.861	0,02	0,52	0,31	360,48			
Kontrolle	35,20	-	197,00	-	1,45	0,87				
3'100-TATA	88,60	53,40	10.220	0,05	1,02	0,61	1.764,79			
3'100-TATA	67,60	32,40	4.497	0,02	1,35	0,81	1.887,58	1.493,86	336,20	24h
3'100-TATA	125,60	90,40	23.110	0,11	1,12	0,67	1.199,14			anaerob
3'100-TATA	58,80	23,60	7.006	0,03	1,05	0,62	1.123,95			
Kontrolle	28,00	-	192	-	0,90	0,54				
3'100-TATA-MU	32,00	4,00	5.737	0,03	0,86	0,51	284,52			
3'100-TATA-MU	32,80	4,80	8.259	0,04	0,69	0,41	293,79			24
3'100-TATA-MU	17,40	-10,60	6.905	0,03	0,87	0,52	-	235,91	75,39	aerob
3'100-TATA-MU	23,80	-4,20	14.015	0,07	0,92	0,55	-			
3'100-TATA-MU	31,80	3,80	10.161	0,05	1,00	0,60	129,43			

Linie	rel.FU/ h	korr. FU/h	Luc- Wert	RLU	Protein- wert	RPU	relative Promotor- aktivität	rel. Promotor- aktivität (Mittelwert)	Std.- Abw.	Zustand
Kontrolle	35,20	-	197	-	1,45	0,87				
3'100-TATA-MU	48,80	13,60	20.658	0,10	0,82	0,49	276,29			24h
3'100-TATA-MU	26,60	-8,60	9.983	0,05	0,68	0,41	-	193,99	58,22	anaerob
3'100-TATA-MU	49,00	13,80	24.632	0,12	1,27	0,76	151,08			
3'100-TATA-MU	45,00	9,80	16.124	0,08	1,35	0,81	154,60			

7.4 Minimalpromotor: Studien im transgenen Tabak

Linie	Aerobe GUS Expression		Anaerobe GUS Expression		Segregation Kan ^{sens} /Kan ^{res}
	FU x h ⁻¹ x µg ⁻¹	pmol 4-MU x Min ⁻¹ x mg ⁻¹	FU x h ⁻¹ x mg ⁻¹	pmol 4-MU x Min ⁻¹ x mg ⁻¹	
ARE _F -1	448	248,86	736	408,85	-
ARE _F -2	127,14	70,63	2204,72	1224,72	1:4
ARE _F -3	16,47	9,15	226,52	125,83	-
ARE _F -4	241,90	134,38	1033,58	574,15	1:5
ARE _F -6	12,21	6,78	41,20	22,89	1:3
ARE _F -7	2,79	1,55	170,50	94,71	1:6
ARE _F -8	5,33	2,96	63,71	35,39	1:3
ARE _F -9	215,33	119,62	1313,07	729,41	1:3
ARE _F -11	4,49	2,49	690,40	383,52	1:4
ARE _F -12	9,05	5,03	29,81	16,56	1:3
ARE _F -13	5,54	3,08	21,40	11,89	1:3
ARE _F Ø	98,93	54,96	650,95	361,60	
ARE _R -4	16,77	9,32	15,68	8,71	1:13
ARE _R -6	65,19	36,21	56,56	31,42	1:13
ARE _R -7	12,30	6,83	30,11	16,73	1:5
ARE _R -8	19,28	10,71	16,38	9,10	1:4
ARE _R -9	7,10	3,94	21,40	11,89	1:2
ARE _R -10	10,26	5,70	21,71	12,06	1:4
ARE _R Ø	21,82	12,12	26,97	14,99	

7.5 GapC4 Promotor in Hefe

YM 954 mit Plasmid	Zelldichte OD ₆₀₀	t [min]	OD ₄₂₀	β-Gal Einheiten	Mittelwert	Std.-Abw.
ohne	1,270	985	0,000	0,000	0,002	0,002
			0,002	0,003		
			0,003	0,005		
	1,260	985	0,003	0,005		
			0,000	0,000		
			0,001	0,002		
	1,108	1140	0,000	0,000	0,001	0,002
			0,000	0,000		
			0,000	0,000		
	1,111	1140	0,000	0,000		
			0,001	0,002		
			0,003	0,005		
pCL1 in SFY 526 (Positivkontr.)	0,811	2	1,285	1584,464	1691,585	78,249
			1,312	1617,756		
			1,376	1696,671		
	0,806	2	1,420	1761,787		
			1,374	1704,715		
			1,438	1784,119		
	0,729	1	0,412	1130,316	1031,196	71,613
			0,388	1064,472		
			0,365	1001,372		
	0,779	1	0,367	942,234		
			0,378	970,475		
			0,420	1078,306		
pYC7	0,734	985	0,128	0,354	0,364	0,032
			0,121	0,335		
			0,129	0,357		
	0,706	985	0,144	0,414		
			0,136	0,391		
			0,116	0,334		

YM 954 mit Plasmid	Zelldichte OD ₆₀₀	t [min]	OD ₄₂₀	β-Gal Einheiten	Mittelwert	Std.-Abw.
pYC7-1xARE	0,705	985	0,112	0,323	0,330	0,019
			0,111	0,320		
			0,105	0,302		
	0,664	985	0,113	0,346		
			0,115	0,352		
			0,111	0,339		
pYC7-4xARE	0,854	90	0,807	20,999	22,895	1,009
			0,875	22,769		
			0,891	23,185		
	0,871	90	0,912	23,264		
			0,940	23,983		
			0,908	23,166		
pYC7-GapC4	0,894	103	0,344	7,472	7,458	0,118
			0,339	7,363		
	0,856	103	0,324	7,350		
			0,329	7,463		
			0,337	7,644		
PYC7-ARE-Mu1	0,568	60	0,247	14,495	13,961	0,905
			0,245	14,378		
			0,248	14,554		
	0,557	60	0,213	12,747		
			0,210	12,567		
			0,224	13,405		
PYC7-ARE-Mu2	0,470	1140	0,040	0,149	0,197	0,051
			0,041	0,153		
			0,040	0,149		
	0,487	1140	0,065	0,234		
			0,068	0,245		
			0,070	0,252		
PYC7-ARE-Mu3	0,521	1140	0,133	0,448	0,405	0,059
			0,135	0,455		
			0,140	0,471		
	0,565	1140	0,110	0,342		
			0,113	0,351		
			0,118	0,366		

YM 954 mit Plasmid	Zelldichte OD ₆₀₀	t [min]	OD ₄₂₀	β-Gal Einheiten	Mittelwert	Std.-Abw.
PYC7-ARE- Mu4	0,559	15	0,342	81,574	69,246	12,196
			0,328	78,235		
			0,340	81,097		
	0,540	15	0,236	58,272		
			0,230	56,790		
			0,241	59,506		

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. habil. Reinhard Hehl, meinem Mentor, für die Überlassung des interessanten Themas, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit, für die ständige Diskussionsbereitschaft, die konstruktiven Vorschläge und die in jeder Weise gewährte Unterstützung, vor allem für die Möglichkeit der Teilnahme am XVI. International Botanical Congress in St. Louis (U.S.A.). Nicht zuletzt möchte ich ihm für die überaus sorgfältige Durchsicht meines Manuskriptes danken.

Herrn Professor Dr. Rüdiger Cerff möchte ich für die Nutzung der Räumlichkeiten und Gerätschaften am Institut für Genetik danken.

Herrn Professor Dr. Ralf Mendel möchte ich dafür danken, dass ich die Einrichtungen seines Instituts nutzen durfte.

Herrn Dr. Robert Hänsch danke ich für die Betreuung im Umgang mit der Partikelkanone, der Einweisung in die Messung des Luziferasetests und die zahlreichen konstruktiven Diskussionen im Hinblick auf die transienten Transformationsexperimente mit Tabakblättern. Außerdem bedanke ich mich für die Überlassung der Plasmide pRT101GUS und pRT101LUC.

Herrn Dr. Kai Schledzewski danke ich für die Einweisung am Fluoreszenzphotometer und für seine wichtigen Beiträge in Bezug auf das β -Glucuronidase Nachweisverfahren in transgenen Tabakpflanzen.

Für die Überlassung des Hefestamms SFY526 und des Plasmids pCl1 danke ich Dr. Martin Lützelberger. Ebenso danke ich Dr. Soo Young Kim und Dr. Terry L. Thomas für die Überlassung der Hefestämme und Plasmide für das One Hybrid System.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern im Labor der Arbeitsgruppe Hehl, besonders Frau Dr. Dorothee Kloss und Frau Elke Faurie, für die vielen fruchtbaren Diskussionen und das besondere Arbeitsklima. Ferner danke ich Frau Faurie für die Einweisung in den Umgang mit

dem A.L.F Sequenziergerät, die Herstellung zahlreicher Oligonukleotide und die Hilfe bei der Herstellung transgener Tabakpflanzen.

Sandra Düwer danke ich für die Unterstützung bei den Mutationsanalysen in der Hefe.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik und des Botanischen Instituts bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima.

Natürlich gilt mein Dank auch all denjenigen, die bei der Erstellung der Arbeit in irgendeiner Weise mitgewirkt haben und bis jetzt noch nicht namentlich genannt wurden.

Abschließend möchte ich meiner Familie einen ganz besonderen Dank aussprechen. Sie haben es verstanden, mich während der Zeit des Zusammenschreibens immer wieder zu motivieren.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Name: Robert Geffers
geboren: 23.10.1968
Geburtsort: Peine
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Institutsadresse: Inst. für Genetik, AG Hehl
Spielmannstr. 7
38106 Braunschweig

1976 – 1979 Grundschule Hohenhameln
1979 – 1988 Gymnasium „Michelsenschule“ in Hildesheim
1988 Abschluß Abitur
1988 - 1990 Soldat auf Zeit. Ausbildung zum Offizier der Reserve
1990 - 1991 Praktikum am Inst. für Tierernährung an der THH Hannover
1991 - 1995 Studium Diplom-Biologie an der Universität Hamburg
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Botanik und Biochemie
1995 - 1996 Diplomarbeit an der TU Braunschweig
Thema: „Kartierung von T-DNAs mit *Ds*-Elementen im Arabidopsisgenom“
Studienabschluß: Diplom-Biologe am 08.03.1996
01.08.1996 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation an der TU Braunschweig am Institut für Genetik in der AG von Dr. habil. Reinhard Hehl mit dem Thema: „Identifizierung cis-regulatorischer Elemente des anaerob induzierbaren *GapC4* Promotors aus Mais in heterologen Systemen sowie Proteinbindungsstudien mit Kernfaktoren aus aeroben und anaerob induzierten Tabakblättern“
1997- 1998 Stipendium im Rahmen des NAFöG durch das Land Niedersachsen
seit 01.01.2000 angestellt bei der Firma BIOBASE- Biologische Datenbanken GmbH